

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro Tecnológico
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

**Uso Racional de Ferramentas de Engenharia Metabólica:
Produção Bacteriana de Hidrogênio e de Violaceína**

ERLON MENDES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química da
Universidade Federal de Santa Catarina como
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto (EQA/UFSC)

Florianópolis, SC
2006

Erlon Mendes

**Uso Racional de Ferramentas de Engenharia Metabólica:
Produção Bacteriana de Hidrogênio e de Violaceína**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química** da Universidade Federal de Santa Catarina

**Área de Concentração
Processos Químicos e Biotecnológicos**

Prof. Dr. Luismar Marques Porto
Orientador

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luismar Marques Porto
Orientador

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Membro Interno

Profª Drª Cíntia Soares
Membro Externo

Florianópolis, SC, Março de 2006

Mendes, Erlon

Uso Racional de Ferramentas de Engenharia Metabólica:
Produção Bacteriana de Hidrogênio e de Violaceína.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química.

1. Ferramentas de Engenharia Metabólica - 2. Hidrogênio - 3.
Violaceína - 4. MFA - 5. MCA

Este trabalho é parte integrante das pesquisas realizadas pelo Grupo de Engenharia Genômica e foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologias Integradas (IntelAB) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

Dedico este trabalho aos meus pais, Ausemir e
Acionir, ao meu irmão Elton e à minha
namorada Zenair por todo o apoio,
compreensão e amor dedicados neste momento
tão importante da minha vida.

Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Luismar Marques Porto pela oportunidade de estudar uma área super interessante e absolutamente nova para mim, pelos conhecimentos prestados, pela orientação, apoio e amizade.

Agradecimento especial aos colegas Gisele Serpa, Daniela Muccillo, Julia Vasconcellos Castro e Itamar Leite de Oliveira por todo o apoio, companheirismo, e grandes idéias que me ajudaram muito na realização deste trabalho.

A todos os colegas do IntelAB, por contribuírem de alguma forma para a realização deste trabalho.

À Coordenadoria de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Agradecimento muito especial aos meus pais Ausemir e Acionir, meu irmão Elton e à minha namorada Zenair por toda a compreensão, apoio, amor e carinho dedicados durante toda a minha vida, e que me fizeram chegar até aqui.

SUMÁRIO

ÍNDICE DAS FIGURAS	9
ÍNDICE DAS TABELAS	12
NOMENCLATURA	13
LISTA DE ABREVIATURAS	14
RESUMO	17
ABSTRACT	18
CAPÍTULO I	19
Introdução, Motivação e Justificativa	19
CAPÍTULO II	22
Revisão Bibliográfica	22
2.1. A análise e o controle de fluxos metabólicos	22
2.1.1. A análise de fluxo metabólico	22
2.1.1.1. A teoria	23
2.1.2. A análise de controle metabólico	25
2.2. A abordagem tradicional, pela maximização da biomassa	27
2.3. A minimização da energia livre como alternativa biológica	29
2.4. A produção biológica de hidrogênio	30
2.5. A produção de violaceína	36
CAPÍTULO III	39
Materiais e Métodos	39
3.1. Toolbox de Engenharia Metabólica para o MATLAB®, ME Toolbox	39
3.1.1. Métodos Computacionais	42
3.1.1.1. Estimativa dos fluxos não medidos	42
3.1.1.2. Reconciliação estatística das medidas	42
3.1.1.3. Análise de sensibilidade	43
3.1.1.4. Criando a matriz estequiométrica G	44
3.1.2. Utilizando o ME Toolbox para análise de fluxo metabólico (MFA)	45
3.1.3. Utilizando o ME Toolbox para MFA com métodos de isótopos marcados (MFAIL)	46
3.1.4. Utilizando o ME Toolbox para MFA de sistemas subdeterminados utilizando programação linear (MFAOP)	49
3.1.5. Utilizando o ME Toolbox para MCA de vias metabólicas lineares (MCA)	51
3.1.6. Utilizando o ME Toolbox para MCA de pontos de bifurcação (MCAB)	53
3.2. Estudo de caso I: análise de fluxo metabólico para a produção de hidrogênio por <i>Clostridium butyricum</i>	54
3.3. Estudo de caso II: análise de fluxo metabólico para a produção de violaceína por <i>Chromobacterium violaceum</i>	60
3.4. Estudo de caso III: análise de fluxo metabólico para um modelo simplificado do metabolismo central de uma célula animal	65
CAPÍTULO IV	69
Resultados e Discussão	69
4.1. Estudo de caso I: análise de fluxo metabólico para a produção de hidrogênio por <i>Clostridium butyricum</i>	69
4.1.1. Classificação do sistema	69
4.1.2. Estimativa dos fluxos não medidos da rede metabólica no regime estacionário	69
4.1.3. Melhoramento estatístico das medidas	71
4.1.4. Análise de sensibilidade	74

4.1.5.	Validação da hipótese de minimização do gasto energético. Análise de fluxo metabólico para produção de hidrogênio usando a função MFAOP	78
4.2.	Estudo de caso II: análise de fluxo metabólico para a produção de violaceína por <i>Chromobacterium violaceum</i>	80
4.3.	Estudo de caso III: análise de fluxo metabólico para um modelo simplificado do metabolismo central de uma célula animal	84
4.4.	Exemplos hipotéticos do uso das funções MCA e MCAB	87
CAPÍTULO V		94
Conclusões e Sugestões		94
5.1.	Conclusões	94
5.2.	Sugestões para trabalhos futuros	95
CAPÍTULO VI		97
Referências Bibliográficas		97
CAPÍTULO VII		100
Apêndice		100
7.1.	Função MFA do ME Toolbox	100
7.2.	Função MFAIL do ME Toolbox	103
7.3.	Função AMM do ME Toolbox	107
7.4.	Função MFAOP do ME Toolbox	108
7.5.	Função MCA do ME Toolbox	110
7.6.	Função KINETICS do ME Toolbox	112
7.7.	Função ELASTICITY do ME Toolbox	114
7.8.	Função MCAB do ME Toolbox	115
7.9.	Função KINETICSB do ME Toolbox	118
7.10.	Função ELASTICITYB do ME Toolbox	119

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 1 – Ilustração da programação linear. A solução ótima está contida na linha AB no quadrante não negativo do espaço solução. A função objetivo consiste numa família de linhas (das quais três são mostradas). A linha que maximiza a função objetivo intercepta a linha AB em $(x,y) = (0,4)$, que representa a solução para este problema de otimização. _____	28
Figura 2 – Modelo esquemático de produção de hidrogênio via biofotólise direta. Fd representa a enzima ferredoxina, e H ₂ ase a enzima hidrogenase. _____	31
Figura 3 – Modelo esquemático de produção de hidrogênio via biofotólise indireta. _	32
Figura 4 – Modelo esquemático de produção de hidrogênio via foto-fermentação. N ₂ ase representa a enzima nitrogenase. _____	33
Figura 5 – Modelo esquemático de produção de hidrogênio via fermentação escura. _	34
Figura 6 – Biossíntese de violaceína, conforme proposta por August et al. (2000). Vio A, Vio B, Vio C e Vio D são genes que formam o operon de produção da violaceína. Os metabólitos são: a) Triptofano, b) 5-Hidroxitriptofano, c) Ácido indol pirúvico, d) Ácido D-2-amino-2-(3-indol) propiônico, e) Pró-desoxiviolaceína, f) Oxindol violaceína, g) Violaceína, h) Oxi-violaceína, i) Desoxiviolaceína. _____	37
Figura 7 – Via metabólica linear generalizada. _____	51
Figura 8 – Exemplo de um ponto de bifurcação em uma via metabólica. _____	53
Figura 9 – Esquema mostrando o modelo para o metabolismo do hidrogênio. O modelo metabólico apresenta dois substratos, glicose e glicerol, formando gliceraldeído-3-fosfato e gerando etanol, butirato e acetato. A partir do glicerol ainda é formado o 1,3-propanodiol. O hidrogênio é formado pelo sistema lateral onde a ferredoxina (Fd) é oxidada formando H ₂ , sendo novamente reduzida pelo piruvato fechando o ciclo. _	55
Figura 10 – Esquema de vias metabólicas mostrando o modelo para a biossíntese de violaceína por <i>Chromobacterium violaceum</i> . O esquema está simplificado, não mostrando todas as etapas intermediárias que geraram as 95 reações usadas na matriz estequiométrica. O modelo utiliza dois substratos, glicose e glicerol. Foram consideradas as reações de formação de biomassa, aminoácidos, nucleotídeos, a via das pentoses e a via de produção da violaceína. _____	61
Figura 11 – Esquema mostrando o modelo simplificado para o metabolismo central de uma célula animal. _____	65
Figura 12 – Fluxos obtidos por balanço de massa simples para a rede de reações em estudo e alimentação com glicose. Gráfico de saída do ME Toolbox. _____	70

Figura 13 – Fluxos obtidos por balanço de massa simples para a rede de reações em estudo e alimentação com glicerol. Gráfico de saída do ME Toolbox.	71
Figura 14 – Novos fluxos obtidos por balanço de massa e melhoramento estatístico para a rede de reações em estudo e alimentação com glicose. Gráfico de saída do ME Toolbox.	73
Figura 15 – Novos fluxos obtidos por balanço de massa e melhoramento estatístico para a rede de reações em estudo e alimentação com glicerol. Gráfico de saída do ME Toolbox.	74
Figura 16 – Sensibilidade acumulada para todos os fluxos medidos. Gráfico de saída do ME Toolbox.	76
Figura 17 – Sensibilidade do fluxo de H_2 a variações nos fluxos medidos. Gráfico de saída do ME Toolbox.	77
Figura 18 – Comparação entre os fluxos obtidos pela função MFA (a) e os estimados pela função MFAOP (b). Gráficos de saída do ME Toolbox.	78
Figura 19 – Comparação entre as sensibilidades acumuladas (a e b), e do H_2 (c e d), obtidas pela função MFA (a e c) e as obtidas pela função MFAOP (b e d). Gráficos de saída do ME Toolbox.	79
Figura 20 – Fluxos da <i>Chromobacterium violaceum</i> obtidos por otimização linear usando a minimização do gasto energético como função objetivo. Os fluxos estão classificados de acordo com a Tabela (12). Gráfico de saída do ME Toolbox.	81
Figura 21 – Sensibilidade acumulada para todos os fluxos extracelulares. Gráfico de saída do ME Toolbox.	82
Figura 22 – Sensibilidade do fluxo de violaceína a variações nos fluxos extracelulares. Gráfico de saída do ME Toolbox.	83
Figura 23 – Taxas dos fluxos medidos e não medidos. Gráfico de saída do ME Toolbox.	84
Figura 24 – Frações de distribuição dos carbonos marcados como resposta a moléculas de piruvato marcadas no terceiro carbono. a) piruvato, b) isocitrato, c) α -cetoglutarato, d) succinato, e) malato e f) oxaloacetato. Gráficos de saída do ME Toolbox.	85
Figura 25 – Frações de distribuição dos carbonos marcados como resposta a moléculas de α -cetoglutarato marcadas no terceiro carbono. a) piruvato; b) isocitrato; c) α -cetoglutarato; d) succinato; e) malato e f) oxaloacetato. Gráficos de saída do ME Toolbox.	86
Figura 26 – Modelagem de uma via metabólica linear de quatro enzimas com inibição do metabólito 3 sobre a enzima 2. O gráfico mostra as concentrações de cada metabólito (X_1 , X_2 e X_3), o fluxo metabólico no estado estacionário (J) e os coeficientes	

de controle de fluxo para cada enzima da via metabólica (C1, C2, C3 e C4). Gráficos de saída do ME Toolbox. _____ 88

Figura 27 – Modelagem de uma via metabólica linear de quatro enzimas sem inibição. O gráfico mostra as concentrações de cada metabólito (X1, X2 e X3), o fluxo metabólico no estado estacionário (J) e os coeficientes de controle de fluxo para cada enzima da via metabólica (C1, C2, C3 e C4). Gráficos de saída do ME Toolbox. _____ 89

Figura 28 – Esquema de uma via bifurcada composta por quatro reações, uma de consumo do substrato e três de produção de produtos. _____ 90

Figura 29 – Modelagem de uma via metabólica bifurcada de quatro enzimas, uma reação de produção e três de consumo do metabólito. O gráfico mostra a concentração do metabólito (X), cada um dos fluxos metabólicos no estado estacionário (J1, J2, J3 e J4) e os coeficientes de controle de fluxo para cada enzima da via metabólica (C1, C2, C3 e C4). Gráficos de saída do ME Toolbox. _____ 91

Figura 30 – Esquema de uma via bifurcada composta por quatro reações, duas de consumo de substratos e duas de produção de produtos. _____ 92

Figura 31 – Modelagem de uma via metabólica bifurcada de quatro enzimas, duas reações de produção e duas de consumo do metabólito. O gráfico mostra a concentração do metabólito (X), cada um dos fluxos metabólicos no estado estacionário (J1, J2, J3 e J4) e os coeficientes de controle de fluxo para cada enzima da via metabólica (C1, C2, C3 e C4). Gráficos de saída do ME Toolbox. _____ 93

ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela 1 – Descrição do ME Toolbox. _____	40
Tabela 2 – Utilização das funções do ME Toolbox. _____	41
Tabela 3 – Parâmetros da função MFA. _____	46
Tabela 4 – Parâmetros da função MFAIL. _____	47
Tabela 5 – Parâmetros da função MFAOP. _____	49
Tabela 6 – Parâmetros da função MCA. _____	52
Tabela 7 – Parâmetros da função MCAB. _____	54
Tabela 8 – Modelo de reações metabólicas para produção de hidrogênio por <i>Clostridium butyricum</i> . _____	56
Tabela 9 – Matriz estequiométrica (G) para a via metabólica proposta. _____	57
Tabela 10 – Fluxos medidos para as condições de alimentação com glicose e glicerol (Sait-Amans et al., 2000). _____	58
Tabela 11 – Energia livre de oxidação por NAD ⁺ a 25°C (Metzler, 1977). _____	60
Tabela 12 – Modelo de reações metabólicas para produção de violaceína em <i>Chromobacterium violaceum</i> . _____	62
Tabela 13 – Energia livre de oxidação por NAD ⁺ a 25°C (Metzler, 1977). _____	64
Tabela 14 – Modelo de reações metabólicas para o metabolismo central simplificado. _____	66
Tabela 15 – Fluxos medidos para as condições de alimentação com glicose e glicerol (Sait-Amans et al., 2000) e as novas estimativas obtidas pelo melhoramento estatístico. _____	72
Tabela 16 – Sensibilidade dos fluxos calculados em relação a variações nos fluxos medidos. _____	75

NOMENCLATURA

C – número condicional.

C_i^J – coeficiente de controle de fluxo da enzima i sobre o fluxo J .

ε – resíduo das medidas ($mmol \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ [célula seca]).

E_i – variação na atividade da enzima i .

$\varepsilon_{X_j}^i$ – coeficiente de elasticidade da i -ésima taxa de reação, v_i , em relação à concentração do metabólito j , X_j .

G – matriz estequiométrica.

G_c – matriz estequiométrica dos fluxos calculados.

G_m – matriz estequiométrica dos fluxos medidos.

h – função teste.

J – fluxo da via no estado estacionário ($mmol \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ [célula seca]).

r_{met} – taxas de síntese dos intermediários nas reações da via metabólica ($mmol \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ [célula seca]).

μ – velocidade específica de crescimento (h^{-1}).

v – vetor dos fluxos de cada reação ($mmol \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ [célula seca]).

v_c – vetor dos fluxos calculados ($mmol \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ [célula seca]).

$v_{c,new}$ – novo vetor dos fluxos calculados, obtido após a reconciliação estatística das medidas ($mmol \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ [célula seca]).

v_i – taxa da reação i ($mmol \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ [célula seca]).

v_m – vetor dos fluxos medidos ($mmol \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ [célula seca]).

$v_{m,new}$ – novo vetor dos fluxos medidos, obtido após a reconciliação estatística das medidas ($mmol \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ [célula seca]).

X_j – concentração do metabólito j ($mmol \cdot g^{-1}$ [célula seca]).

X_{met} – vetor das concentrações dos metabólitos ($mmol \cdot g^{-1}$ [célula seca]).

LISTA DE ABREVIATURAS

3DDAH7P – 3-Desoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato
3HBCOA – 3-Hidroxibutiril-CoA
3HPRAL – 3-Hidroxipropionaldeído
3PDGL – 3-P-D-glicerato
3PSME – o-(1-Carboxivinil)-3-D-shiquimato
5HTRP – 5-Hidroxitriptofano
5MTA – 5-Metiltioadenosina
AACOA – Acetoacetil-CoA
AC – Acetato
ACCOA – Acetil-CoA
ACP – Acetil-fosfato
ACTAL – Acetaldeído
ADP – Adenosina difosfato
AICAR – 5-Fosforibosil-5-amino-4-imidazol carboxamida
AIPRO – Ácido D-2-amino-2-(3-indol) propiônico
AKG – α -Cetoglutarato
ALA – Alanina
AMP – Adenosina monofosfato
AN – Antranilate
ARG – Arginina
ASER – o-Acetilserina
ASN – Asparagina
ASP – Aspartato
ASPSA – Aspartato β -semialdeído
ATP – Adenosine trifosfato
BUCOA – Butiril-CoA
BUTP – Butiril-fosfato
CAP – Carbamoil fosfato
CHOR – Corismato
CIT – Citrulina
COA – Coenzima A-SH
CRCOA – Crotonil-CoA
CYS – Cisteína
D23PIC – 2,3-Dihidrodipicolinato
D26PIM – 1,1,2,6-Diaminopimelato
D6PGC – D-6-Fosfoglucono- δ -lactona
DHAC – Dihidroxiacetona
DHAP – Dihidroxiacetona-fosfato
DIMGP – D-Eritromidazoleglicerol-fosfato
DQT – 3-Dehidroquinato
DSAM – SAM Descarboxilado
E4P – Eritrose-4-fosfato
F1,6P – Frutose-1,6-bifosfato

F6P – Frutose-6-fosfato
 FAD – Flavina adenina dinucleotídeo oxidada
 FADH2 – Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
 FCC – Coeficiente de controle de fluxo
 Fd_(ox) – Ferredoxina em seu estado oxidado
 Fd_(red) – Ferredoxina em seu estado reduzido
 FUM – Fumarato
 G1P – Glicose-1-fosfato
 G3P – Gliceraldeído-3-fosfato
 G6P – Glicose-6-fosfato
 GDP – Guanosina difosfato
 GL – Glicerol
 GL3P – Glicerol-3-fosfato
 GLC – Glicose
 GLN – Glutamina
 GLU – Glutamato
 GLUP – Glutamil fosfato
 GLX – Glioxilato
 GLY – Glicina
 GTP – Guanosina trifosfato
 H₂ase – Hidrogenase
 HCYS – Homocisteína
 HIS – Histidina
 HISOLP – 1-Histidinol-fosfato
 HPHPYR – p-Hidroxi fenilpiruvato
 HSER – Homocерina
 ICIT – Isocitrato
 ILE – Isoleucina
 IMACP – Imidazol acetil-fosfato
 IPYR – Ácido indol pirúvido
 LYS – L-Lysine
 MAL – Malato
 MCA – Análise de controle metabólico (do inglês *metabolic control analysis*)
 MET – Metionina
 METTHF – 5,10-Metileno tetrahydrofolato
 MFA – Análise de fluxo metabólico (do inglês *metabolic flux analysis*)
 MTHF – 5,10-Metil tetrahydrofolato
 N₂ase – Nitrogenase
 NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
 NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
 NADP – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
 NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
 NAGLU – N-Acetil glutamato
 NPRAN – N-5-Fosforibosil-antranilato
 OA – Oxaloacetato
 OBUT – Oxobutirato

OIVAL – Oxoisovalerato
 OIVIO – Oxiviolaceína
 ORN – Ornitina
 PEMFC – Células de combustível de membrana trocadora de prótons (do inglês *proton exchange membrane fuel cells*).
 PEP – Fosfoenolpiruvato
 PFL – Piruvato formato liase
 PFOR – Piruvato ferredoxina (flavodoxina) oxiredutase
 PHE – Fenilalanina
 PHEN – Prefenato
 PHPYR – Fenilpiruvato
 PI – Fosfato inorgânico
 PIP26DX – δ -Piperidina-2,6-dicarboxilato
 PPI – Pirofosfato
 PRBATP – Fosforibosil-ATP
 PRO – Prolina
 PRPP – Fosforibosil pirofosfato
 PTRSC – Putrecina
 PVIO – Prodesoxiviolaceína
 PYR – Piruvato
 R5P – Ribose-5-fosfato
 RL5P – D-Ribulose-5-fosfato
 S7P – D-Sedoheptulose-7-fosfato
 SER – Serina
 SME – Shiquimato
 SME5P – Shiquimato-5-fosfato
 SPRMD – Spermidina
 SUCC – Succinato
 SUCCOA – Succinil-CoA
 T3P1 – Gliceraldeído-3-fosfato
 T3P2 – Dihidroxiacetona-fosfato
 THF – Tetrahidrofolato
 THR – Treonina
 TRP – Triptofano
 TYR – Tirosina
 VAL – Valina
 VIO – Violaceína
 X5P – Xilulose-5-fosfato

RESUMO

MENDES, Erlon. **Uso Racional de Ferramentas de Engenharia Metabólica: Produção Bacteriana de Hidrogênio e de Violaceína.** 2006. 117p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFSC, Florianópolis, SC.

A quantificação da magnitude de cada um dos fluxos celulares sempre foi um importante objetivo na engenharia metabólica, principalmente com relação à produção de metabólitos de interesse comercial ou científico. Uma ferramenta poderosa para determinação das taxas dos fluxos em vias metabólicas é a análise de fluxo metabólico (MFA), onde taxas de fluxos intracelulares são calculadas usando modelos estequiométricos de uma gama de reações intracelulares e aplicação de balanços de massa. No entanto, MFA por si só não fornece qualquer medida quantitativa do controle de fluxo, que é importante para manter as taxas de síntese e conversão diante de uma grande gama de condições externas. Além disso, o entendimento dos controles de fluxo é importante para modificação racional dos fluxos metabólicos, que é um dos objetivos centrais da engenharia metabólica. Tal informação é fornecida pela análise de controle metabólico (MCA). O MATLAB® apresenta uma família de funções que servem a aplicações específicas, chamadas toolboxes. Toolboxes são coleções de funções do MATLAB® (arquivos .M) que estendem o ambiente do MATLAB® para resolver classes particulares de problemas. O presente trabalho tem como objetivo principal a apresentação de um toolbox para o MATLAB® que integra a maioria das ferramentas e cálculos em análise de fluxo metabólico (MFA) e análise de controle metabólico (MCA), o ME Toolbox. A versão atual do ME Toolbox permite a obtenção de fluxos intracelulares, melhoria dos fluxos por reconciliação estatística, análise de sensibilidade, análise de fluxo metabólico usando métodos de marcadores isotópicos, e análise de controle metabólico para redes lineares e bifurcadas, abrangendo assim uma grande gama de possibilidades em engenharia metabólica. O ME Toolbox foi aplicado para produção de hidrogênio por *Clostridium butyricum*, um potencial substituto para combustíveis à base de carbono, e para produção de violaceína por *Chromobacterium violaceum*, pigmento de cor violeta que apresenta atividade antimicrobiana, antiviral, e antitumoral.

Palavras Chave: Ferramentas de Engenharia Metabólica, Hidrogênio, Violaceína, MFA e MCA.

ABSTRACT

MENDES, Erlon. **Rational Use of Metabolic Engineering Tools: Hydrogen and Violacein Bacterial Production.** 2006. 117p. Dissertation (Masters Degree in Chemical Engineering) – Post-Graduation Program in Chemical Engineering, UFSC, Florianópolis, SC.

Quantification of the magnitude of each cellular flux was always an important objective in metabolic engineering, mostly concerned with commercial and scientific metabolite production. A powerful tool for flux rate determinations in metabolic pathways is the metabolic flux analysis (MFA). Using MFA one may calculate intracellular flux rates, starting from a stoichiometric model for the various intracellular reactions and mass balance. However, MFA by itself does not supply any quantitative information on the control of fluxes, an important goal for keeping the rates of synthesis and conversion over a great range of external conditions. Besides, the understanding of the flux controls is important for the rational modification of metabolic fluxes, which is one of the main objectives of metabolic engineering. Such information is supplied by the metabolic control analysis (MCA). A family of MATLAB® add-on application-specific solutions for solving metabolic engineering problems was used in this study. MATLAB® toolboxes are comprehensive collections of MATLAB® M-files that extend the MATLAB® environment. The present work has as main objective the presentation of a toolbox for MATLAB® that integrates most of the tools and calculations in metabolic flux analysis (MFA) and metabolic control analysis (MCA), the ME Toolbox. The current version of the ME Toolbox allows calculation of intracellular fluxes, improvement of fluxes by statistical reconciliation, and to perform sensitivity analysis, metabolic flux analysis using isotope labeling methods, and metabolic control analysis for linear and branched pathways. Those techniques embrace a great range of possibilities in metabolic engineering. The ME Toolbox was applied for hydrogen production by *Clostridium butyricum*, an interesting substitute for carbon based fuel, and for violacein production by *Chromobacterium violaceum*, a violet pigment that presents antimicrobial, antiviral and anticancer activities.

Keywords: Metabolic Engineering Tools, Hydrogen, Violacein, MFA and MCA.

CAPÍTULO I

Introdução, Motivação e Justificativa

A manipulação de vias metabólicas com o objetivo de favorecer microrganismos com propriedades desejáveis é um desejo muito antigo (Stephanopoulos et al., 1998). Existem vários exemplos bem sucedidos dessas estratégias na produção de aminoácidos, antibióticos, solventes e vitaminas. O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular para recombinação do DNA introduziu uma nova dimensão para a manipulação de vias metabólicas. A engenharia genética permitiu a modificação precisa de reações enzimáticas específicas em vias metabólicas e, portanto, a construção de conhecimentos genéticos bem definidos, que permitem o desenvolvimento de organismos metabolicamente “engenheirados”.

A engenharia metabólica define-se como

o melhoramento dirigido de formação de produtos ou propriedades celulares através da modificação de reações bioquímicas específicas ou a introdução de novas com o uso da tecnologia de DNA recombinante (Stephanopoulos et al., 1998).

A obtenção do alvo da modificação ou introdução de uma reação específica é uma característica essencial da engenharia metabólica. A quantificação da magnitude de cada um dos fluxos intracelulares sempre foi um importante objetivo na engenharia metabólica, principalmente com relação à produção de metabólitos de interesse comercial. Uma ferramenta poderosa para determinação das taxas dos fluxos em vias metabólicas é a análise de fluxo metabólico (MFA, do inglês *metabolic flux analysis*), onde taxas de fluxos intracelulares são calculadas usando modelos estequiométricos de uma gama de reações intracelulares e a aplicação de balanços de massa.

No entanto, MFA por si só não fornece qualquer medida quantitativa do controle de fluxo, que é importante para manter as taxas de síntese e conversão diante de uma grande gama de condições externas. Além disso, o

entendimento dos controles de fluxo é importante para a modificação racional dos fluxos metabólicos, que é um dos objetivos centrais da engenharia metabólica. Tal informação é fornecida pela análise de controle metabólico (MCA, do inglês, *metabolic control analysis*), que auxilia na descoberta da resposta do fluxo metabólico a uma pequena variação na atividade de uma enzima.

Neste trabalho, esses conceitos foram testados em dois estudos de caso: a produção de hidrogênio por *Clostridium butyricum*, e a produção de violaceína por *Chromobacterium violaceum*.

A maior parte da necessidade global de energia é dependente de combustíveis fósseis que, além de serem fontes não renováveis e cada vez mais escassas, ainda causam sérias variações climáticas devido à emissão dos gases poluentes gerados como resultado de suas combustões. Com o objetivo de remediar a escassez de combustíveis fósseis e seus graves problemas ambientais, o hidrogênio tem sido sugerido como carreador de energia do futuro. O hidrogênio é considerado o combustível do futuro devido a sua alta eficiência na conversão, reciclabilidade e natureza não poluente. A produção biológica de hidrogênio apresenta menor impacto ambiental e menor necessidade energética se comparada com os processos termoquímicos e eletroquímicos (Debabrata e Nejat, 2001).

A produção biológica de hidrogênio por via bacteriana constitui-se, pois, em um interessante modelo para o estudo de engenharia metabólica, sobretudo quando se considera a possibilidade de maximizar as principais fontes energéticas que, no futuro, poderão ser substituídas.

Um outro modelo metabólico interessante, e que vem sendo amplamente estudado pelo Grupo de Engenharia Genômica, é a produção de violaceína por *Chromobacterium violaceum*. O estudo para a sua produção em larga escala pode se beneficiar do conhecimento dos fluxos intracelulares que fazem parte da sua via de biossíntese, e a sensibilidade do fluxo em estudo a

variações nos fluxos extracelulares pode indicar as rotas mais eficientes de mutação genética para obtenção de uma bactéria superprodutora de violaceína.

Para tornar a metodologia desenvolvida para estudos de engenharia metabólica um conjunto de ferramentas úteis para a análise da produção de metabólitos secundários, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Desenvolvimento da técnica de minimização de energia livre para a análise de vias metabólicas;
- Análise de fluxo metabólico para a produção de hidrogênio por *Clostridium butyricum*;
- Análise de fluxo metabólico para a produção de violaceína por *Chromobacterium violaceum*;
- Integração de técnicas computacionais de engenharia metabólica em um toolbox para o MATLAB®.

Como parte deste trabalho, criou-se o ME Toolbox (Metabolic Engineering Toolbox), que permite a realização semi-automática de análises de fluxo metabólico, o estudo de controle de fluxos através de parâmetros de controle, e a distribuição de isotopômeros. Neste último caso, o toolbox foi testado para o metabolismo central de uma célula animal.

CAPÍTULO II

Revisão Bibliográfica

2.1. A análise e o controle de fluxos metabólicos

2.1.1. A análise de fluxo metabólico

A quantificação da magnitude dos fluxos metabólicos *in vivo* é um importante objetivo em fisiologia celular e engenharia metabólica, principalmente no que diz respeito à produção de produtos úteis comercialmente e cientificamente. A análise de fluxo metabólico é uma metodologia eficiente para a obtenção dos fluxos metabólicos, onde as reações intracelulares são quantificadas a partir de fluxos extracelulares utilizando modelos estequiométricos e técnicas de balanço de massa.

A análise de fluxo metabólico não só permite a quantificação de fluxos intracelulares, como também indica as rotas mais eficientes para o melhor aproveitamento do substrato na produção de um metabólito de interesse, como, por exemplo, a obtenção de mutantes super-produtores do metabólito desejado.

A análise de fluxo metabólico ainda fornece várias informações adicionais (Stephanopoulos et al., 1998):

- *Identificação dos controles dos pontos de bifurcação* – É possível, através da separação de fluxos em diferentes condições e com diferentes mutantes, saber a flexibilidade ou a rigidez de pontos de bifurcação.
- *Identificação de vias metabólicas alternativas* – A formulação da estequiometria das reações, que é a base do MFA, requer conhecimento detalhado da rota bioquímica atual, pela qual os substratos são convertidos em produtos. Isso, no entanto, pode não ser claro para muitos microorganismos e muitas vias metabólicas alternativas podem ser identificadas.

- *Cálculo de fluxos extracelulares não medidos* – Em alguns casos, o número de fluxos extracelulares que podem ser medidos é menor do que o necessário para o cálculo de fluxos intracelulares desconhecidos. Nesses casos, é possível obter tais fluxos usando programação linear.
- *Cálculo de rendimentos teóricos máximos* – A separação dos fluxos pode ser ajustada de forma a maximizar a quantidade do produto formado e ainda identificar os metabólitos limitantes.

2.1.1.1. A teoria

A forma geral da equação do balanço de massa para um estado variável é dada pela seguinte equação diferencial (Stephanopoulos et al., 1998):

$$\frac{d\mathbf{X}_{\text{met}}}{dt} = \mathbf{r}_{\text{met}} - \mu \mathbf{X}_{\text{met}} . \quad (1)$$

O primeiro termo do lado direito representa a rede de taxas de síntese dos intermediários nas reações da via metabólica. O segundo termo descreve a diluição do conjunto de metabólitos devido ao crescimento da biomassa. No entanto, devido ao baixo nível intracelular da maioria dos metabólitos, tais efeitos de diluição são considerados muito pequenos se comparados com os fluxos que afetam os mesmos metabólitos. Isso faz com que o segundo termo do lado direito da Equação (1) seja usualmente considerado zero. Admitindo que exista uma alta regeneração da maioria dos metabólitos, suas concentrações rapidamente se ajustam aos novos níveis, fazendo com que a hipótese de estado pseudo-estacionário seja aplicável. Isso faz com que o primeiro termo da Equação (1) seja igualado à zero. As taxas de síntese de cada reação podem ser decompostas como o produto da transposta da matriz estequiométrica e o vetor de todas as taxas de reação. Logo, chega-se ao seguinte balanço simplificado:

$$\mathbf{0} = \mathbf{r}_{\text{met}} = \mathbf{G}' \mathbf{v} , \quad (2)$$

onde \mathbf{G} representa a matriz dos coeficientes estequiométricos, chamada matriz estequiométrica, e \mathbf{v} representa o vetor dos fluxos de cada reação. A linha na Equação (2) representa a transposta da matriz estequiométrica \mathbf{G} . A Equação (2) é a base para análise de fluxo metabólico e representa K balanços algébricos lineares para K metabólitos com J fluxos desconhecidos. Como o número de reações (J) é sempre maior que o número de metabólitos da via (K), existe sempre um certo grau de liberdade no conjunto de equações algébricas dado por $F = J - K$. Portanto, para solução do sistema, alguns elementos de “ \mathbf{v} ” devem ser medidos ou conhecidos para que o sistema seja determinado. Se exatamente F fluxos são medidos, o sistema torna-se *determinado* e a solução é única. Caso o número de fluxos medidos seja superior a F , o sistema é *superdeterminado*, significando que existem equações extras que podem ser usadas para testar a consistência dos balanços globais. No entanto, se o número de fluxos medidos é inferior a F , o sistema é *subdeterminado*, e os fluxos desconhecidos podem ser determinados apenas se restrições adicionais forem induzidas ou se um critério de otimização global for imposto aos balanços metabólicos. Em um sistema determinado, podemos obter os fluxos desconhecidos particionando a Equação (2) da seguinte forma:

$$\mathbf{0} = \mathbf{G}' \mathbf{v} = \mathbf{G}'_{\mathbf{m}} \mathbf{v}_{\mathbf{m}} + \mathbf{G}'_{\mathbf{c}} \mathbf{v}_{\mathbf{c}}, \quad (3)$$

onde os índices \mathbf{m} e \mathbf{c} representam os fluxos medidos e os que se deseja calcular respectivamente. Uma vez que F é exatamente igual ao número de fluxos medidos (sistema determinado), $\mathbf{G}_{\mathbf{c}}$ é uma matriz quadrada (dimensões $K \times K$) e, portanto, inversível. Os elementos de $\mathbf{v}_{\mathbf{c}}$ podem então ser obtidos pela Equação (4):

$$\mathbf{v}_{\mathbf{c}} = -(\mathbf{G}'_{\mathbf{c}})^{-1} \mathbf{G}'_{\mathbf{m}} \mathbf{v}_{\mathbf{m}}. \quad (4)$$

Para os sistemas superdeterminados, $\mathbf{G}_{\mathbf{c}}$ não é inversível e a solução para a Equação (4) pode ser obtida pelo uso da pseudo-inversa de Moore-Penrose.

$$(\mathbf{G}'_{\mathbf{c}})^{\#} = (\mathbf{G}_{\mathbf{c}} \mathbf{G}'_{\mathbf{c}})^{-1} \mathbf{G}_{\mathbf{c}}. \quad (5)$$

Desta forma, a Equação (4) passa a ser:

$$\mathbf{v}_c = -(\mathbf{G}_c')^\# \mathbf{G}_m' \mathbf{v}_m. \quad (6)$$

Observe que, se \mathbf{G}_c é uma matriz quadrada, sua pseudo-inversa será a própria inversa.

A Equação (6) é muito útil quando o nível de ruído nas medidas é pequeno. Baixo nível de ruído representa que os resíduos das medidas são distribuídos uniformemente entre os fluxos. No entanto, se um ruído significativo apresenta-se apenas em alguns fluxos medidos, a solução pode não satisfazer a conservação dos fluxos e, portanto, ao balanço de massa em alguns nós. Uma forma tradicional de resolver o problema é fazer uma reconciliação estatística das medidas. A reconciliação estatística das medidas usa ferramentas de estatística para que os valores experimentais se adaptem melhor aos balanços de massa propostos, isto é, os dados experimentais são melhorados. Maiores detalhes sobre a reconciliação estatística serão apresentados em materiais e métodos.

2.1.2. A análise de controle metabólico

A análise de fluxo metabólico (MFA) pode ser utilizada para o estudo das interações entre diferentes vias metabólicas e quantificação da distribuição dos fluxos ao redor dos pontos de bifurcação. No entanto, a análise de fluxo metabólico por si só não fornece qualquer medida quantitativa do *controle de fluxo*, que é o responsável por manter as taxas de síntese e conversão de metabólitos balanceada, diante de uma grande variedade de condições externas, sem aumento ou queda significativa nas concentrações intracelulares dos metabólitos. Com o conhecimento do controle de fluxo é possível saber, a partir de modelos cinéticos em pontos isolados da via, o que aconteceria com o fluxo metabólico se alterássemos o nível de expressão de uma determinada

enzima. Tal informação permite uma modificação racional dos fluxos metabólicos, que é o principal objetivo da engenharia metabólica.

Os aspectos fundamentais da rede são obtidos através da sensibilidade das variáveis do sistema, que são os fluxos ou níveis de metabólitos, a variações nos parâmetros do sistema, que são as atividades enzimáticas ou níveis de substrato e produto. Estas sensibilidades são também chamadas de coeficientes de controle.

Sendo J o fluxo no estado estacionário e E_i a atividade da enzima i , o *coeficiente de controle de fluxo* (FCC), C_i^J , é definido como a taxa da variação relativa no fluxo (dJ/J) sobre a variação relativa na atividade da enzima i (dE_i/E_i) (Stephanopoulos et al., 1998).

$$C_i^J = \frac{dJ/J}{dE_i/E_i} = \frac{E_i}{J} \frac{dJ}{dE_i} = \frac{d \ln J}{d \ln E_i} \quad (7)$$

Pela definição dos FCC's, a enzima com o maior coeficiente de controle de fluxo exerce maior influência sobre o controle de fluxo em um determinado regime estacionário.

Como os FCC's são definidos em termos de fluxos relativos e atividades relativas, eles são adimensionais e suas magnitudes são independentes das unidades utilizadas nos fluxos e nas atividades enzimáticas. Uma consequência importante da normalização dos FCC's é que, relativo a cada fluxo, a soma de todos os FCC's deve ser um. Isso é conhecido como o *teorema da soma dos controles de fluxo*:

$$\sum_{i=1}^L C_i^{J_k} = 1 \quad k \in \{1, 2, \dots, L\}. \quad (8)$$

Outro conceito importante em MCA é o *coeficiente de elasticidade*. Diferentemente dos coeficientes de controle, que são propriedades sistêmicas de todo o sistema metabólico, elasticidades são propriedades locais de enzimas individuais na rede metabólica. A elasticidade da i -ésima taxa de reação, v_i , em relação à concentração do metabólito j , X_j , é definida como a taxa da variação

relativa na taxa de reação com relação a uma variação infinitesimal na concentração do metabólito, assumindo que todas as outras variáveis do sistema não variam de seus valores do regime estacionário, isto é:

$$\varepsilon_{X_j}^i = \frac{\partial v_i / v_i}{\partial X_j / X_j} = \frac{X_j}{v_i} \frac{\partial v_i}{\partial X_j} = \frac{\partial \ln v_i}{\partial \ln X_j}. \quad (9)$$

Se a redução na atividade de uma enzima tem um efeito pequeno no fluxo geral, significa que o coeficiente de controle da enzima perturbada é pequeno. De forma similar, a perturbação de uma enzima com pequena elasticidade relacionada a seu metabólito intermediário pode causar uma variação significativa no fluxo. Esta relação entre coeficientes de controle de fluxo e elasticidades é expressa segundo o *teorema da conectividade dos controles de fluxo*, expresso por:

$$\sum_{i=1}^L C_i^{J_K} \varepsilon_{X_j}^i = 0 \quad i \in \{1, 2, \dots, L\}, \quad j \in \{1, 2, \dots, K\}. \quad (10)$$

Este teorema diz como a cinética de uma enzima afeta localmente o fluxo global. Em geral, pode-se concluir que enzimas com grandes FCC's possuem pequenos coeficientes de elasticidade, e vice-versa. Portanto, é improvável que enzimas que respondem rapidamente à variações nos níveis dos metabólitos, isto é, possuem grande elasticidade, exerçam maior controle no fluxo global do que enzimas que respondem lentamente a variações nos níveis de metabólitos.

2.2. A abordagem tradicional, pela maximização da biomassa

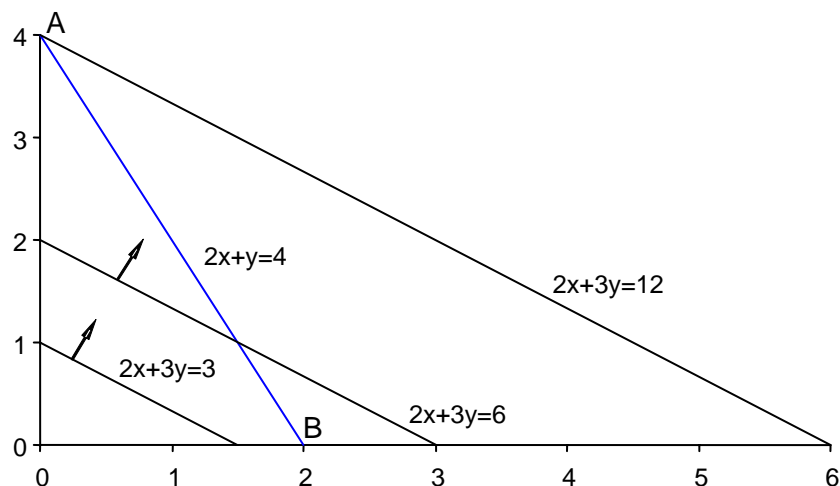
Quando o número de fluxos medidos é inferior ao grau de liberdade do sistema, existe um número infinito de soluções para os fluxos metabólicos (sistema subdeterminado). Nesses casos, a *programação linear* pode ser usada para determinar a distribuição dos fluxos. Para tanto, torna-se necessário o uso de uma função que força a solução do sistema para satisfazer determinado objetivo, a chamada *função objetivo*.

Uma descrição básica da programação linear é apresentada por Stephanopoulos et al. (1998).

Considerando o sistema de duas variáveis, x e y , relacionadas através da seguinte equação:

$$2 \cdot x + y = 4 \quad (11)$$

Uma restrição comum a todos os problemas de programação linear é que todas as variáveis devem ser não-negativas. Essa limitação restringe o espaço de soluções ao primeiro quadrante, mesmo assim existem infinitas soluções para o sistema. No entanto, se uma função objetivo for aplicada ao sistema, por exemplo, maximizar $2 \cdot x + 3 \cdot y$, o sistema passa a ter uma única solução, $x = 0$ e $y = 4$, conforme ilustrado na Figura (1).



Fonte: Stephanopoulos et al., 1998.

Figura 1 - Ilustração da programação linear. A solução ótima está contida na linha AB no quadrante não negativo do espaço solução. A função objetivo consiste numa família de linhas (das quais três são mostradas). A linha que maximiza a função objetivo intercepta a linha AB em $(x,y) = (0,4)$, que representa a solução para este problema de otimização.

Varma (1993) usaram MFA por programação linear para interpretar o catabolismo da glicose por *Escherichia coli* sob vários níveis de oxigenação. Neste trabalho foi possível prever as mudanças no metabolismo celular quando o consumo de oxigênio vai ficando debilitado. A seqüência de produtos que é obtida na passagem de um sistema aeróbico para anaeróbico (acetato, formato e

etanol), foi reproduzida com programação linear usando a maximização da taxa de formação de biomassa como função objetivo.

Ozkan (2005) fizeram mutantes de *Escherichia coli* para superprodução da *proteína de ligação glicose isomerase-maltose* (Gl-malE). O estudo do metabolismo da bactéria mutante foi feito usando MFA por programação linear em um sistema de 411 reações, também usando a taxa de formação de biomassa.

Bell e Palsson (2005) introduziram a teoria da *análise do plano fase*, cuja principal diferença da análise de fluxo metabólico convencional é a definição de um campo de comportamentos fenotípicos ótimos quando duas condições variam. Suas aplicações incluem a comparação do crescimento de uma linhagem em diferentes substratos, análise das conseqüências de deleções no gene, e experimentos de design.

2.3. A minimização da energia livre como alternativa biológica

A minimização do gasto energético é outra estratégia utilizada para a análise de fluxo metabólico por otimização linear. Cortassa et al. (2002) sugerem dois tipos de função objetivo: (i) a maximização do crescimento de biomassa, metodologia amplamente utilizada quando o modelo metabólico é complexo demais para a obtenção dos dados experimentais necessários a um sistema determinado, e (ii) a minimização do gasto energético, que pode ser obtida pela minimização das taxas das reações em que ocorre produção de ATP. A função objetivo utilizada para os sistemas subdeterminados do presente trabalho também se baseia na minimização do gasto energético, mas de uma forma mais complexa, utilizando um balanço energético entre produtos e substratos da via metabólica.

2.4. A produção biológica de hidrogênio

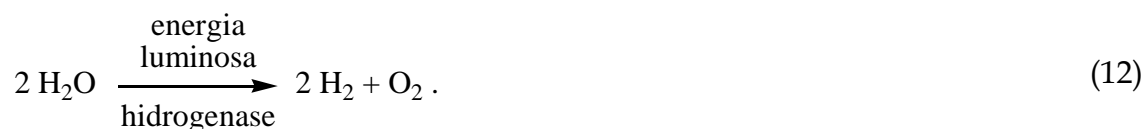
A utilização de combustíveis fósseis vem sendo apontada como fator de agravamento que está causando aquecimento global, degradação do meio ambiente e problemas de saúde. Além disso, os recursos de combustíveis fósseis são limitados, não renováveis e o uso indiscriminado eventualmente levará ao fim dos mesmos nas próximas décadas.

Devido a sua alta conversão, reciclabilidade e natureza não poluente, o hidrogênio é considerado o combustível do futuro (Debabrata e Nejat, 2001).

O hidrogênio pode ser produzido por inúmeros processos, incluindo a eletrólise da água, a reforma termocatalítica de compostos orgânicos ricos em hidrogênio, e processos biológicos. Atualmente o hidrogênio é produzido quase que exclusivamente por eletrólise da água ou por reforma a vapor do metano. A produção biológica de hidrogênio usando microrganismos é uma área nova do desenvolvimento tecnológico que oferece potencial de produção de hidrogênio a partir de uma grande variedade de recursos renováveis (Levin et al., 2004).

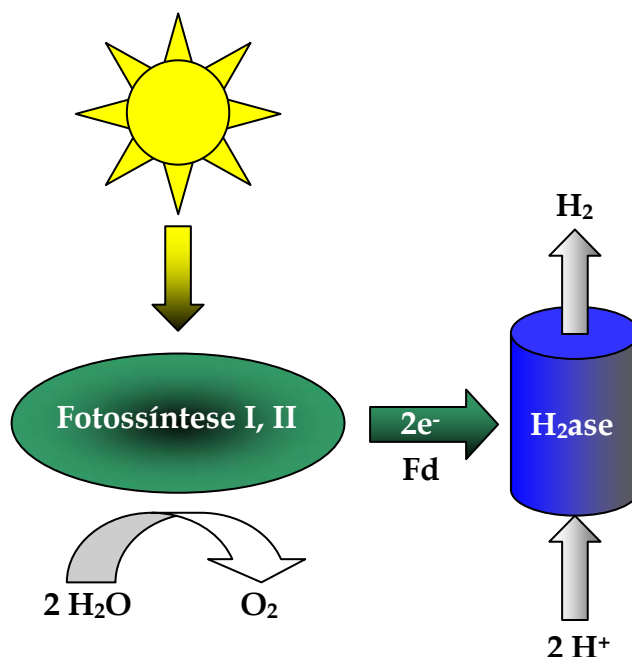
A produção biológica de hidrogênio possui várias abordagens. Dentre elas, destacam-se: biofotólise direta, biofotólise indireta, foto-fermentação e fermentação escura (Hallenbeck e Benemann, 2002; Levin et al., 2004).

A *biofotólise direta* é um processo em que microalgas verdes capturam luz e a energia recuperada é usada para juntar duas moléculas de água para a geração de um redutor de baixo potencial, que pode ser usado para reduzir uma enzima hidrogenase que produz hidrogênio (Figura 2), seguindo a seguinte reação geral:



As microalgas verdes utilizam energia luminosa para gerar elétrons que são transferidos para uma molécula de ferredoxina, tomando a sua forma

reduzida. A enzima hidrogenase combina os prótons (H^+) do meio com elétrons doados pela ferredoxina reduzida, para formar e liberar H_2 .



Fonte: Hallenbeck e Benemann, 2002.

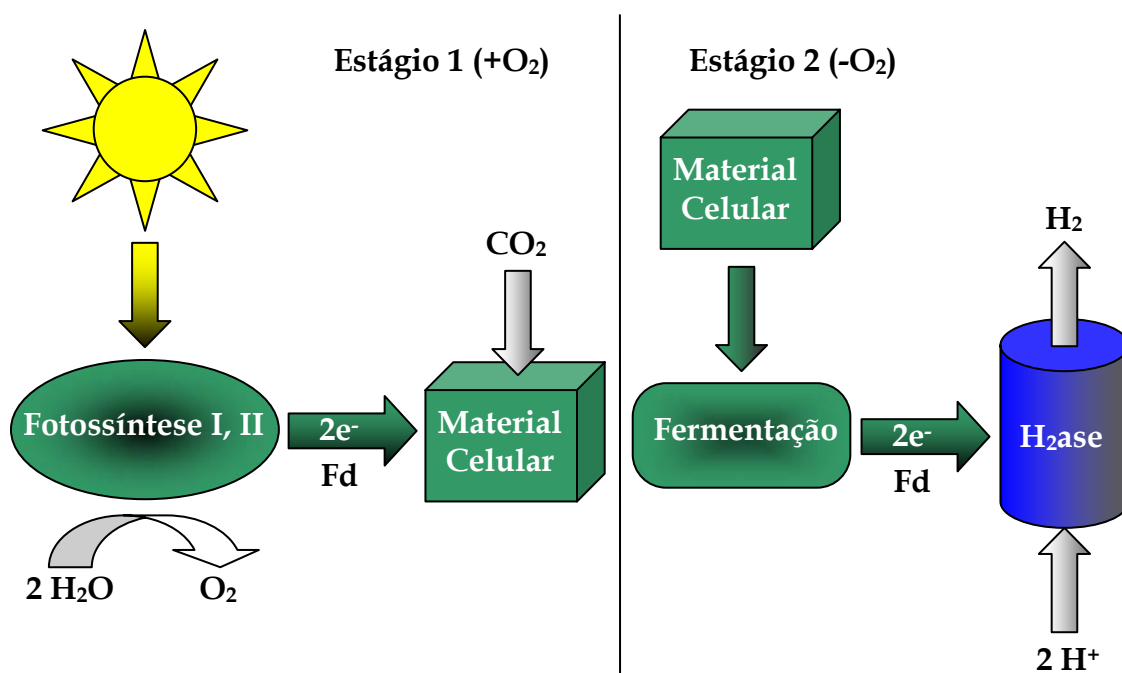
Figura 2 – Modelo esquemático de produção de hidrogênio via biofotólise direta. Fd representa a enzima ferredoxina, e H_2ase a enzima hidrogenase.

Infelizmente, como a etapa escura é a etapa limitante, a eficiência na conversão da luz solar é de apenas 10%, apresentando maior eficiência em menor fluxo solar. Além disso, a atividade enzimática da hidrogenase, principal enzima para a produção de hidrogênio, é extremamente sensível ao oxigênio, sendo necessárias condições especiais para o sistema, cujas baixas pressões parciais seriam impossíveis de se manter em qualquer processo prático de biofotólise direta (Hallenbeck e Benemann, 2002).

O uso de mutagenese clássica tem proporcionado um sucesso limitado na obtenção de mutantes com tolerância ao oxigênio (Hallenbeck e Benemann, 2002), mas estes apresentam apenas aumento na atividade respiratória e, portanto, provendo um melhoramento aparente na resistência ao oxigênio. Mesmo se o problema da inibição pelo oxigênio fosse superado, a biofotólise

direta requer grandes fotobiorreatores e separação do H_2 e O_2 , que tornaria o processo impraticável.

A *biofotólise indireta* tenta resolver o problema da sensibilidade ao oxigênio separando a evolução do oxigênio e do hidrogênio em dois estágios, através da fixação de CO_2 (Figura 3).



Fonte: Hallenbeck e Benemann, 2002.

Figura 3 – Modelo esquemático de produção de hidrogênio via biofotólise indireta.

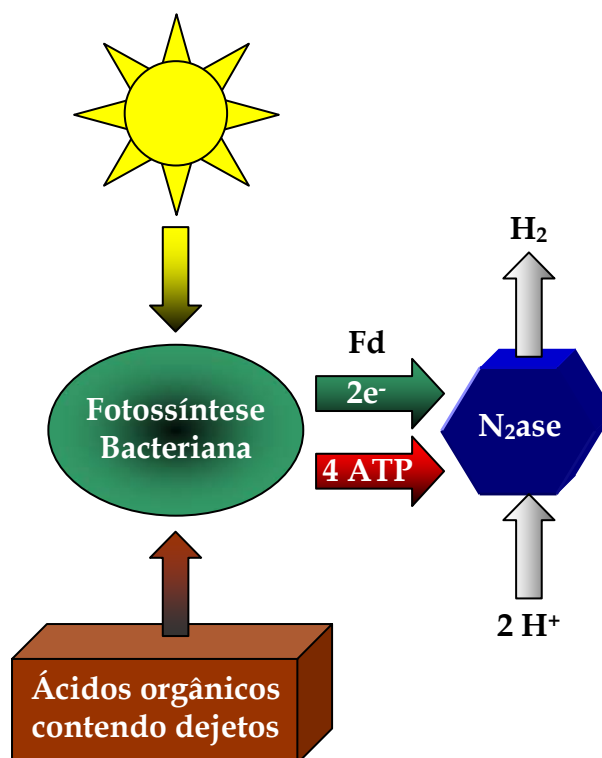
Uma elaboração deste conceito envolve quatro passos distintos (Hallenbeck e Benemann, 2002):

1. Produção de alta concentração de biomassa e armazenamento de carboidratos em tanques a 10% de eficiência solar;
2. Concentração da biomassa dos tanques em um tanque de decantação;
3. Fermentação escura anaeróbica para produzir 4 mol de H_2 /mol de glicose armazenada nas células das algas, mais 2 mols de acetato;

4. Um fotobiorreator no qual as células das algas converteriam os dois moles de acetato para 8 moles de H_2 .

Infelizmente os processos de biofotólise indireta ainda estão em estágio conceitual. Seus aspectos econômicos ainda precisam ser demonstrados mesmo em nível experimental.

Nas *foto-fermentações*, bactérias púrpuras produzem hidrogênio molecular catalisado pela nitrogenase sob condições de deficiência em nitrogênio, usando energia luminosa e ácidos orgânicos reduzidos (Figura 4).



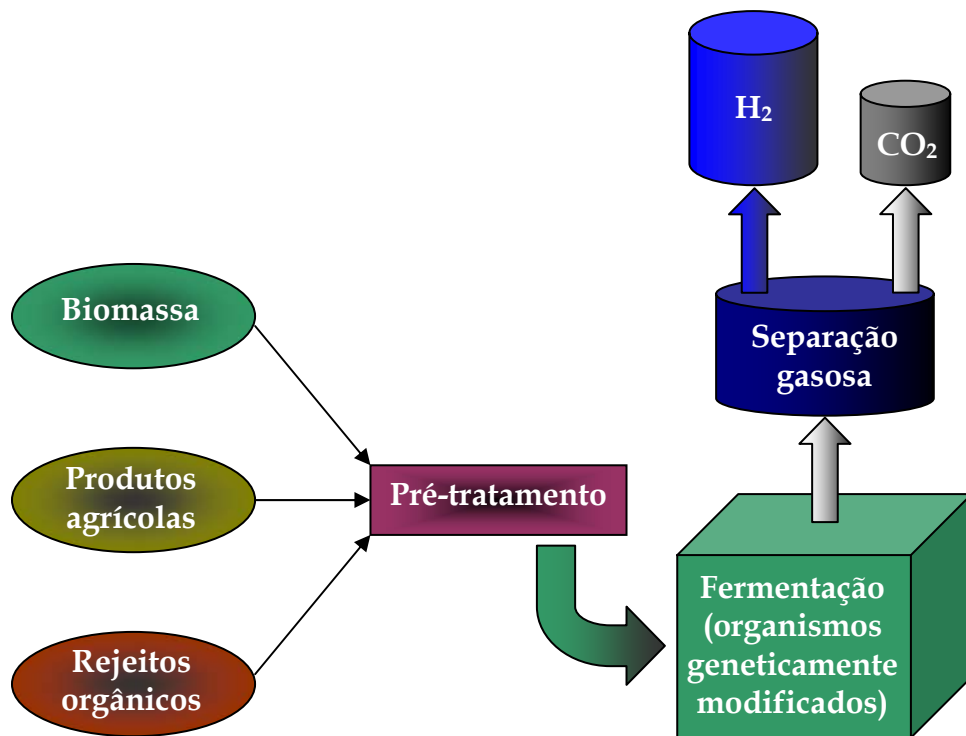
Fonte: Hallenbeck e Benemann, 2002.

Figura 4 – Modelo esquemático de produção de hidrogênio via foto-fermentação. N_2ase representa a enzima nitrogenase.

Assim como nos demais processos fotossintetizantes, as foto-fermentações apresentam eficiências cada vez mais baixas sob alta luminosidade. As taxas e eficiências na produção de hidrogênio nesse e em todos os outros sistemas envolvendo diretamente a fotossíntese para produção de H_2 estão longe de qualquer viabilidade econômica plausível.

A *fermentação escura* é o processo onde bactérias anaeróbicas produzem hidrogênio principalmente pelo metabolismo anaeróbico do piruvato, formado durante o catabolismo de vários substratos (Figura 5).

Bactérias conhecidas produtoras de hidrogênio são das espécies *Enterobacter*, *Bacillus* e *Clostridium*.



Fonte: Hallenbeck e Benemann, 2002.

Figura 5 – Modelo esquemático de produção de hidrogênio via fermentação escura.

A quebra do piruvato é catalisada por um dos dois sistemas enzimáticos:

1) Piruvato formato liase (PFL):

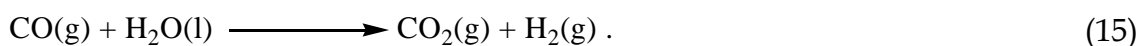


2) Piruvato ferredoxina (flavodoxina) oxidoreductase (PFOR):



Nas duas reações, o piruvato gerado pela glicólise é usado, na ausência de oxigênio, para produzir acetil-CoA, que pode gerar ATP, e ainda formato ou ferredoxina reduzida ($\text{Fd}_{(\text{red})}$), que pode gerar hidrogênio.

Certas bactérias fotoheterotróficas da superfamília *Rhodospirillaceae* podem crescer na ausência de luz usando CO como única fonte de carbono para gerar ATP com liberação de H_2 e CO_2 . A oxidação de CO para CO_2 com liberação de H_2 ocorre via *reação de deslocamento gás-água* (CO-água):



Utilizando resultados de outros trabalhos de diversas produções biológicas de hidrogênio, Levin et al. (2004) fizeram um estudo de viabilidade na produção de biorreatores que pudessem suprir hidrogênio suficiente para uso em células de combustível de membrana trocadora de prótons (*proton exchange membrane fuel cells* - PEMFC). Três capacidades diferentes 1,5; 2,5 e 5 kW foram tidas como suficientes para gerar eletricidade a fim de suprir a demanda energética de uma casa típica norte americana sem aquecimento interno, com aquecimento interno e armazenamento de energia, e com aquecimento interno sem sistema de armazenamento, respectivamente. O resultado das análises mostrou que sistemas baseados em fotossíntese não possuem taxas de produção de hidrogênio suficientes para carregar células de combustível, mesmo de 1 kW. No entanto, alguns sistemas de fermentação escura e reação de deslocamento CO-água de *R. gelatinosus* CBS apresentaram resultados promissores.

Biorreatores de tamanhos razoáveis seriam suficientes para carregar células de energia de 5 kW usando um grupo de bactérias mesofílicas, enriquecido para a espécie *Clostridium*. Um biorreator de aproximadamente 500 L forneceria hidrogênio suficiente para carregar uma PEMFC de 2,5 kW, enquanto 1.000 L forneceria hidrogênio suficiente para uma PEMFC de 5 kW.

A reação de deslocamento CO-água de *R. gelatinosus* CBS é intrigante uma vez que oferece potencial para captura e reforma de CO para produção de

H₂. Um reator de aproximadamente 624 L seria necessário para fornecer hidrogênio suficiente para uma PEMFC de 2,5 kW e um reator de 1.250 L para uma PEMFC de 5 kW (Levin et al., 2004).

Biorreatores de 1.000 a 1.500 L na base de uma casa não são impensáveis visto que tanques de aquecimento de óleo com aproximadamente este tamanho são usados em algumas casas norte-americanas.

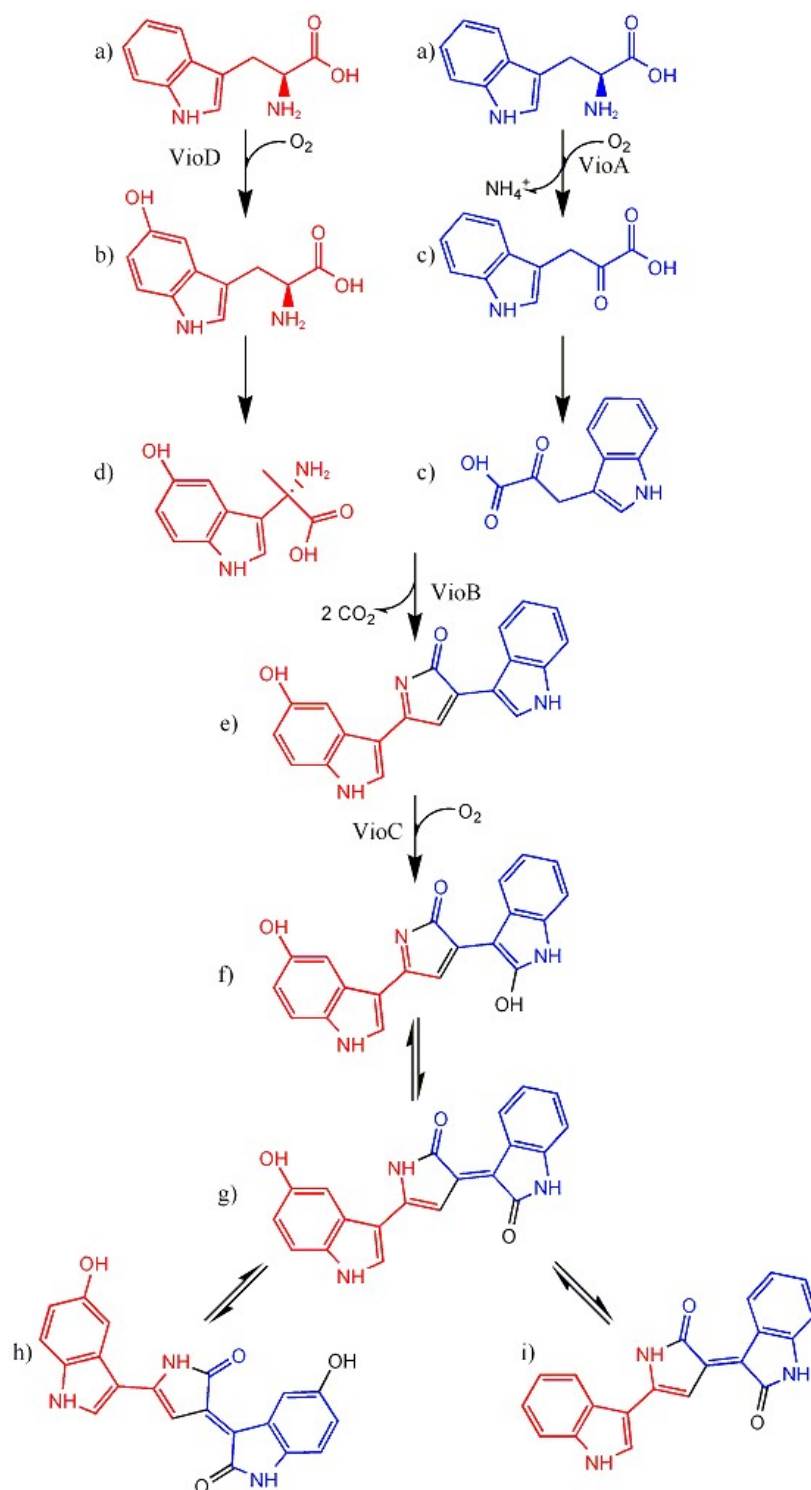
Cabe ressaltar que os volumes dos reatores foram baseados em taxas obtidas por experimentos de laboratório, sendo necessárias mais pesquisas para determinar se o aumento da escala influenciaria na produção de H₂.

2.5. A produção de violaceína

Chromobacterium violaceum é uma β -proteobactéria Gram-negativa, predominante em uma variedade de ecossistemas nas regiões tropicais e subtropicais. Esta bactéria tem sido encontrada em maior abundância nas águas das margens do Rio Negro. A três décadas a *C. violaceum* tem sido fonte de estudos no Brasil. Em geral, tais estudos têm sido focados num pigmento violeta chamado violaceína, que vem sendo usado como composto terapêutico para fins dermatológicos. A violaceína apresenta atividades antipatogênicas, bactericidas, antivirais e antitumorais (Vasconcelos et al. 2003).

O seqüenciamento desta bactéria pelo *Consórcio Nacional Brasileiro do Projeto Genoma* revelou detalhes de sua complexidade que explicam sua versatilidade e abriu fronteiras para o estudo do seu potencial biotecnológico.

August et al. (2000) seqüenciou e clonou o “operon vioABCD”, sendo seus resultados posteriormente confirmados pelo seqüenciamento completo da *C. violaceum*. No mesmo trabalho é sugerido um mecanismo de biossíntese da violaceína, mostrado na Figura (6).



Adaptado de August et al., 2000.

Figura 6 – Biossíntese de violaceína, conforme proposta por August et al. (2000). Vio A, Vio B, Vio C e Vio D são genes que formam o operon de produção da violaceína. Os metabólitos são: a) Triptofano, b) 5-Hidroxitriptofano, c) Ácido indol pirúvido, d) Ácido *D*-2-amino-2-(3-indol) propiônico, e) Pró-desoxiviolaceína, f) Oxindol violaceína, g) Violaceína, h) Oxi-violaceína, i) Desoxiviolaceína.

A via de biossíntese mostrada na Figura (6) foi a peça chave para a análise de fluxo metabólico para produção de violaceína.

CAPÍTULO III

Materiais e Métodos

3.1. Toolbox de Engenharia Metabólica para o MATLAB®, ME Toolbox

A análise de fluxo metabólico (MFA) e análise de controle metabólico (MCA) são ferramentas bem estabelecidas e largamente utilizadas para quantificação de fluxos celulares (Vallino e Stephanopoulos, 1993; Chatziannou et al., 2003; Nadeau et al., 2000; Shimizu et al., 2003; Shirai et al., 2005), no estudo da sensibilidade dos fluxos em relação a pequenas perturbações nas medidas (Chatziannou et al., 2003), no uso de marcadores isotópicos para estudar o metabolismo (McCabe e Previs, 2004) e análise dos coeficientes de controle de fluxos em pontos de bifurcação chaves da via metabólica (Shimizu et al., 2003; Heijnen et al., 2004).

MFA e MCA são ferramentas muito importantes na engenharia metabólica, apresentam suas limitações e vantagens quando analisadas separadamente mas, se combinadas sabiamente, fornecem informações do funcionamento celular com um alto nível de detalhamento.

Um dos objetivos deste trabalho é a apresentação de um toolbox para o MATLAB® que integra a maioria das ferramentas e cálculos em análise de fluxo metabólico e análise de controle metabólico, o ME Toolbox (Tabela 1).

Tabela 1 – Descrição do ME Toolbox.

<i>Função</i>	<i>Descrição</i>	<i>Parâmetros de entrada</i>	<i>Parâmetros de saída</i>	<i>Observações</i>
MFA	Executa a análise de fluxo metabólico para um sistema determinado ou superdeterminado.	G, vm, p, pcs.	vc, R, rk, vmnew, vcnew, h, e, answ, C, accum, spec.	
MFAIL	Executa a análise de fluxo metabólico utilizando métodos de carbono marcado.	G, vm, p	vc, R, rk, answ, xpyr, xicit, xakg, xsuc, xmal, xaaa.	Necessita da interatividade do usuário para adaptar a função a novos problemas.
AMM	Função auxiliar do MFAIL. Constrói as matrizes de mapeamento atômico.	m, n	mn	
MFAOP	Executa a análise de fluxo metabólico para um sistema subdeterminado.	f, SP, EF, G, pcs.	x, fval, exitflag, output, lambda, C.	
MCA	Executa a análise de controle metabólico para uma via linear.	o, lev.	xin, Ein, Cin, x, E, C, Xstore, Cstore, fcst, fcct.	Necessita das variáveis globais: s, p, Em, kcat, Keq, km, answ, inhib, Ki.
KINETICS	Função auxiliar do MCA. Constrói as equações cinéticas automaticamente. Usada para a obtenção das variáveis do sistema (concentrações e o fluxo) no estado estacionário.	x	f	Necessita das variáveis globais: s, p, Em, kcat, Keq, km, answ, inhib, Ki.
ELASTICITY	Função auxiliar do MCA. Calcula os coeficientes de elasticidade automaticamente.	x	e	Necessita das variáveis globais: s, p, Em, kcat, Keq, km, answ, inhib, Ki.
MCAB	Executa a análise de controle metabólico para um ponto de bifurcação.	J, dep, lev.	xin, Ein, Cin, x, E, C, Jstore, Xstore, Cstore, XJstore.	Necessita das variáveis globais: s, p, Em, kcat, Keq, km, k.

KINETICSB	Função auxiliar do MCAB. Constrói as equações cinéticas automaticamente.	x	f	Necessita das variáveis globais: s, p, Em, kcat, Keq, km, k.
ELASTICITYB	Função auxiliar do MCAB. Calcula os coeficientes de elasticidade automaticamente.	x	e	Necessita das variáveis globais: s, p, Em, kcat, Keq, km.

Para explicar a utilização do ME Toolbox, serão apresentados três estudos de casos: a MFA para a produção biológica de hidrogênio por *Clostridium butyricum*, a MFAIL para um modelo metabólico simplificado do metabolismo central com o uso de marcadores isotópicos, e a MFAOP para estimativas dos fluxos em *Chromobacterium violaceum*, sob a hipótese de minimização do gasto energético. Além dos estudos de casos, serão avaliados exemplos hipotéticos do uso das funções MCA e MCAB (Tabela 2).

Tabela 2 – Utilização das funções do ME Toolbox.

<i>Função</i>	<i>Produção de hidrogênio</i>	<i>Produção de violaceína</i>	<i>Metabolismo central</i>	<i>Exemplos hipotéticos</i>
MFA	x			
MFAIL			x	
AMM			x	
MFAOP	x	x		
MCA				x
KINETICS				x
ELASTICITY				x
MCAB				x
KINETICSB				x
ELASTICITYB				x

A versão atual do ME Toolbox permite a obtenção de todos os fluxos intracelulares por balanço de massa, melhoria dos dados experimentais por reconciliação estatística, análise de sensibilidade, análise de fluxo metabólico usando métodos de marcadores isotópicos, análise de fluxo metabólico de sistemas subdeterminados por programação linear, análise de controle metabólico de vias não bifurcadas, e análise de controle metabólico de pontos de bifurcação.

3.1.1. Métodos Computacionais

Todos os métodos computacionais mostrados a seguir foram implementados usando o pacote de programação computacional MATLAB® (The Math Works Inc., MA, USA) e baseados nas equações apresentadas por Stephanopoulos et al. (1998).

3.1.1.1. Estimativa dos fluxos não medidos

Todos os fluxos não medidos experimentalmente são obtidos, em primeira análise, utilizando a Equação (6).

3.1.1.2. Reconciliação estatística das medidas

Com o objetivo de obterem-se melhores estimativas para ambos, fluxos medidos e não medidos, uma reconciliação estatística das medidas é implementada, como descrita por Stephanopoulos et al. (1998). Como foi dito anteriormente, a reconciliação estatística usa ferramentas de estatística para que os dados experimentais sejam melhorados, adaptando-os melhor aos balanços de massa e reduzindo os erros experimentais.

Para a obtenção das relações estequiométricas de uma rede metabólica em formato matricial, devem-se identificar as reações linearmente dependentes. Para isso, primeiramente obtém-se a matriz de redundância **R**, cujo “rank” indica quais equações do sistema são linearmente independentes.

$$\mathbf{R} = \mathbf{G}_m' - \mathbf{G}_c' (\mathbf{G}_c')^\# \mathbf{G}_m' \quad (16)$$

Conforme descrito na revisão bibliográfica, a linha sobre as matrizes representa suas transpostas, \mathbf{G}_m e \mathbf{G}_c são o resultado do particionamento da matriz estequiométrica **G** onde os índices, **m** e **c**, representam os fluxos

medidos e os que se deseja calcular, respectivamente. $(\mathbf{G}_c')^\#$ representa a pseudo-inversa da matriz \mathbf{G}_c' .

De posse do número de equações linearmente independentes, obtém-se a matriz de redundância reduzida, \mathbf{R}_r :

$$\mathbf{R}_r = \mathbf{K} \mathbf{R}, \quad (17)$$

onde \mathbf{K} é um vetor de dimensões $(1 \times j)$, sendo j o número de colunas da matriz \mathbf{G} , com uns nas posições referentes às linhas linearmente dependentes, obtidas após a análise do “rank” da matriz de redundância, e zeros nas demais posições. A partir da matriz de redundância reduzida, o resíduo ε é obtido:

$$\varepsilon = \mathbf{R}_r \mathbf{v}_m. \quad (18)$$

O resíduo é, então, usado para o cálculo da função teste h , definida como:

$$h = \varepsilon' (\mathbf{R}_r \mathbf{R}_r')^{-1} \varepsilon. \quad (19)$$

Assume-se que a função teste h segue distribuição χ^2 e indica se os ruídos das medidas estão ou não correlacionados entre si. Os graus de liberdade da distribuição χ^2 são iguais ao “rank” da matriz de redundância \mathbf{R} . Novas estimativas para os fluxos medidos são, então, obtidas:

$$\mathbf{v}_{m,\text{new}} = \left(\mathbf{I} - \mathbf{R}_r' (\mathbf{R}_r \mathbf{R}_r')^{-1} \mathbf{R}_r \right) \mathbf{v}_m. \quad (20)$$

E a partir dos novos fluxos medidos, melhorados estatisticamente, novos fluxos calculados são estimados a partir da Equação (6).

3.1.1.3. Análise de sensibilidade

A medida da sensibilidade de uma matriz é também chamada de número condicional, C , cuja magnitude fornece informações importantes sobre os requisitos de precisão nos fluxos medidos:

$$C = \|G'\| \|G'\|^{\#}. \quad (21)$$

Para uma matriz estequiométrica ser considerada bem condicionada, o número condicional deve estar entre 1 e 100. Como o número condicional não fornece nenhuma informação sobre a sensibilidade dos cálculos no que diz respeito à variações nos fluxos medidos, tal informação é obtida pelos elementos da matriz solução.

$$\frac{dv_c}{dv_m} = -(G'_c)^{\#} G'_m. \quad (22)$$

A Equação (22) mostra a sensibilidade dos fluxos calculados a pequenas perturbações nas medidas (Stephanopoulos et al., 1998).

O ME Toolbox desenvolvido neste trabalho gera as sensibilidades acumuladas em toda a rede metabólica, mostrando quais fluxos medidos têm maior importância em toda a rede, e as sensibilidades com relação a um fluxo calculado (não medido) de interesse, selecionado por um escalar *pcs* que indica a posição do mesmo na matriz estequiométrica **G**.

É interessante observar que a análise de sensibilidade não depende de dados experimentais e está presente nas funções MFA e MFAOP.

De posse das equações das atividades enzimáticas das vias lineares ou dos pontos de bifurcação de maior interesse, ainda é possível usar as funções MCA e MCAB para fazer a análise de controle metabólico dessas regiões chave para a produção de um metabólito de interesse.

3.1.1.4. Criando a matriz estequiométrica **G**

A matriz estequiométrica reconhecida pelo ME Toolbox é uma matriz (*i* × *j*) onde *i* é o número de reações (fluxos) e *j* é o número de metabólitos, isto é, cada linha representa uma reação da rede metabólica e cada coluna representa um dos metabólitos presente nesta rede.

Primeiramente, deve-se identificar todos os metabólitos presentes na rede e colocá-los, sem repetições, na primeira linha de uma planilha eletrônica, deixando a primeira coluna em branco para identificar as reações. Identificar os metabólitos ordenadamente resulta em menor esforço computacional e, conseqüentemente, maior velocidade. Cria-se, na primeira coluna, um indicador para cada reação.

Para finalizar a estrutura matricial, devem-se dividir os metabólitos em três grupos: substratos, produtos e metabólitos internos, movendo suas colunas conforme necessário.

Construída a estrutura matricial, parti-se para a representação da rede metabólica. Cada reação deve ser criada colocando-se os índices estequiométricos abaixo de cada metabólito e zeros nas demais posições. Os índices estequiométricos devem ser positivos para os produtos e negativos quando para os reagentes.

Das três matrizes obtidas, apenas a matriz dos metabólitos internos é utilizada, e deverá ser exportada no formato de texto separado por espaços. O conteúdo do texto precisará ser copiado e colado em um arquivo de entrada de dados para o ME Toolbox.

3.1.2. Utilizando o ME Toolbox para análise de fluxo metabólico (MFA)

A função MFA do ME Toolbox possui a seguinte forma canônica:

$$[vc,R,rk,vmnew,vcnew,h,e,answ,C,accum,spec] = \text{MFA}(G,vm,p,pcs). \quad (23)$$

Os parâmetros de entrada e saída, bem como suas descrições, estão mostrados na Tabela (3).

Tabela 3 – Parâmetros da função MFA.

<i>Parâmetros de entrada</i>	
<i>Parâmetro</i>	<i>Descrição</i>
G	Matriz estequiométrica.
vm	Vetor contendo os fluxos extracelulares medidos.
p	Vetor contendo as posições relativas aos fluxos do vetor “vm” na matriz estequiométrica “G”.
pcs	Posição relativa ao fluxo de interesse para análise de sensibilidade.
<i>Parâmetros de saída</i>	
<i>Parâmetro</i>	<i>Descrição</i>
vc	Vetor contendo os fluxos intracelulares calculados.
R	Matriz de redundância.
rk	“Rank” da matriz de redundância.
vmnew	Vetor contendo os fluxos extracelulares melhorados estatisticamente.
vcnew	Vetor contendo os fluxos intracelulares recalculados a partir de “vmnew”.
h	Valor da função teste “h”.
e	Valor do resíduo “ε”.
answ	Resposta se a solução é única ou não.
C	Valor do número condicional.
accum	Matriz contendo o somatório do módulo das sensibilidades para cada fluxo extracelular.
spec	Matriz contendo a sensibilidade do fluxo indicado em “pcs” a variações nos fluxos extracelulares.

3.1.3. Utilizando o ME Toolbox para MFA com métodos de isótopos marcados (MFAIL)

Outra análise muito importante que pode ser feita com o ME Toolbox é a análise de fluxo metabólico usando métodos de isótopos marcados, através da função MFAIL.

$$[vc, R, rk, answ, x] = \mathbf{MFAIL} (G, vm, p). \quad (24)$$

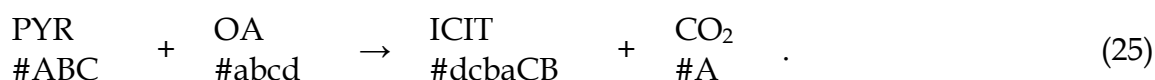
Os parâmetros de entrada e saída, bem como suas descrições, estão mostrados na Tabela (4).

Tabela 4 – Parâmetros da função MFAIL.

<i>Parâmetros de entrada</i>	
<i>Parâmetro</i>	<i>Descrição</i>
G	Matriz estequiométrica.
vm	Vetor contendo os fluxos extracelulares medidos.
p	Vetor contendo as posições relativas aos fluxos do vetor “vm” na matriz estequiométrica “G”.
<i>Parâmetros de saída</i>	
<i>Parâmetro</i>	<i>Descrição</i>
vc	Vetor contendo os fluxos intracelulares calculados.
answ	Resposta se a solução é única ou não.
x	Matriz contendo todas as frações de carbonos marcados em cada um dos produtos.

Através do MFAIL é possível prever a fração de carbonos marcados para cada produto, como resposta a substratos marcados em um dos carbonos.

Inicialmente, o MFAIL calcula os fluxos intracelulares usando a Equação (6). Depois disso, utilizando as configurações de carbonos conhecidos para cada uma das reações da via, são construídas as *matrizes de mapeamento atômico*. As matrizes de mapeamento atômico são matrizes de dimensões $(i \times j)$, onde i é o número carbonos do produto e j o número de carbonos do reagente. As posições onde o reagente passou um carbono para o produto recebem o número 1. Veja, por exemplo, a seguinte reação:



Para a construção da matriz de mapeamento atômico que relaciona piruvato (PYR) com isocitrato (ICIT), deve-se primeiramente construir uma matriz nula de dimensões (6×3) , que são o número de carbonos do isocitrato e piruvato, respectivamente.

$$PYR > ICIT = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} . \quad (26)$$

A partir da configuração dos carbonos, presente abaixo dos metabólitos, sabe-se que o carbono B do piruvato é o último carbono do isocitrato, e que o carbono C do piruvato é o penúltimo carbono do isocitrato. Dessa forma, chega-se à matriz de mapeamento atômico (Equação 27):

$$PYR > ICIT = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix}. \quad (27)$$

A função MFAIL usa a função AMM para criar as matrizes de mapeamento atômico de uma forma mais fácil. Para obter a matriz de mapeamento atômico da Equação (27), bastaria executar a seguinte seqüência de comandos:

```
pyr = ['A', 'B', 'C'];  
icit = ['d', 'c', 'b', 'a', 'C', 'B'];  
pyr_icit = AMM (pyr, icit) \quad (28)
```

A função AMM executa uma comparação membro a membro de dois vetores de caracteres, criando a matriz de mapeamento atômico automaticamente. Pode-se observar que os vetores **pyr** e **icit** contêm exatamente os caracteres que estão abaixo da reação (Equação 25).

Construídas as matrizes de mapeamento atômico, a função MFAIL combina os vetores \mathbf{v}_m e \mathbf{v}_c em um único vetor \mathbf{v} contendo todos os fluxos em suas respectivas posições. Por fim, o MFAIL resolve um sistema linear contendo todos os balanços dos estados de marcação da via metabólica.

A função MFAIL é a única função do ME Toolbox que precisa ser adaptada ao problema do usuário. A enorme variedade de casos em engenharia metabólica tornou impossível a obtenção de um padrão de consenso para construção automática do sistema linear.

Maiores detalhes sobre o uso do MFAIL estão presentes no estudo de caso do modelo metabólico simplificado para o metabolismo central com o uso de marcadores isotópicos.

3.1.4. Utilizando o ME Toolbox para MFA de sistemas subdeterminados utilizando programação linear (MFAOP)

A função MFAOP faz uma estimativa de todos os fluxos utilizando apenas um fluxo experimental, segundo uma função objetivo.

$$[x, fval, exitflag, output, lambda, C] = \text{MFAOP}(f, SP, EF, G, pcs). \quad (29)$$

Os parâmetros de entrada e saída, bem como suas descrições, estão mostrados na Tabela (5).

Tabela 5 – Parâmetros da função MFAOP.

<i>Parâmetros de entrada</i>	
<i>Parâmetro</i>	<i>Descrição</i>
f	Função objetivo.
SP	Matriz de posições dos substratos. A primeira coluna é composta de um escalar que representa o substrato (1, 2, ...), e a segunda coluna representa a posição do respectivo substrato na matriz estequiométrica.
EF	Vetor contendo o fluxo experimental. O primeiro termo do vetor representa a posição do fluxo experimental, e o segundo termo representa o seu valor (a taxa do fluxo).
G	Matriz estequiométrica.
pcs	Posição relativa ao fluxo de interesse para análise de sensibilidade.
<i>Parâmetros de saída</i>	
<i>Parâmetro</i>	<i>Descrição</i>
x	Vetor contendo os fluxos intracelulares calculados.
fval	Valor da função objetivo em “x”.
exitflag	Descrição das condições de saída. > 0 quando a programação linear convergiu para uma solução em “x”, 0 quando a programação linear alcançou o número máximo de iterações sem convergir, e < 0 quando o sistema linear não tiver solução.
output	Indica o número de iterações.
lambda	Retorna o conjunto de multiplicadores de Lagrange.
C	Valor do número condicional.

O MFAOP encontra a solução para o sistema linear da Equação (2) e executa uma análise de sensibilidade segundo as Equações (21 e 22).

Para a determinação da função objetivo, parte-se do pressuposto que o objetivo de uma célula, em determinadas condições, é minimizar o gasto energético para o seu metabolismo. Esta proposta está baseada na crença de que a minimização da energia utilizada por um microrganismo é pelo menos tão importante, do ponto vista evolutivo, quanto a otimização da produção celular (biomassa). Nem sempre a maximização da biomassa é prioritária para o microrganismo. Por exemplo, a *C. violaceum*, quando cultivada em glicerol no lugar de glicose, diminui sua multiplicação celular e produz mais violaceína (provavelmente associada a mecanismos de defesa); por outro lado, quando há deficiência de nitrogênio, a produção de biopolímeros (no caso da *C. violaceum*, poli-hidroxicanoatos) é maximizada, claramente como mecanismo de acúmulo de energia de reserva.

Dessa forma, propôs-se a construção da seguinte função objetivo f :

$$\min f = \sum_{\text{reagentes}} n \cdot \Delta G'_{ox} - \sum_{\text{produtos}} n \cdot \Delta G'_{ox} . \quad (30)$$

Diferentemente de qualquer teoria proposta até então, a função objetivo mostrada na Equação (30) propõe um balanço energético, tipo “black box”, a ser minimizado. Na Equação (30), n representa o número de moles, obtidos através dos fluxos das reações de consumo de substrato e formação de produtos, e $\Delta G'_{ox}$ é a variação da energia livre de Gibbs a pH 7 para oxidação por NAD^+ . Como se trata de um balanço black box, apenas os substratos e os produtos finais da via metabólica foram postos na função objetivo.

Maiores detalhes sobre o uso do MFAOP estão presentes nos estudos de casos da análise de fluxo metabólico para produção de hidrogênio por *Clostridium butyricum* e também na análise de fluxo metabólico para produção de violaceína por *Chromobacterium violaceum*.

3.1.5. Utilizando o ME Toolbox para MCA de vias metabólicas lineares (MCA)

A função MCA do toolbox foi projetada para fazer a análise de controle metabólico para vias lineares com a seguinte linha de comando:

$$[\text{xin}, \text{Ein}, \text{Cin}, \text{x}, \text{E}, \text{C}, \text{Xstore}, \text{Cstore}, \text{fcst}, \text{fcct}] = \text{MCA}(\text{o}, \text{lev}). \quad (31)$$

Uma via metabólica linear é uma via composta por um número qualquer de metabólitos mas que não possui pontos de bifurcação (Figura 7).

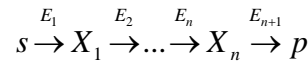


Figura 7 – Via metabólica linear generalizada.

Para uma via metabólica linear, os teoremas descritos nas Equações (8) e (10) podem ser resumidos em forma de matriz:

$$\begin{pmatrix} 1 & 1 & \dots & 1 \\ \varepsilon_{X_1}^1 & \varepsilon_{X_1}^2 & \dots & \varepsilon_{X_1}^L \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ \varepsilon_{X_K}^1 & \varepsilon_{X_K}^2 & \dots & \varepsilon_{X_K}^L \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_1^J & -C_1^{X_1} & \dots & -C_1^{X_{L-1}} \\ C_2^J & -C_2^{X_1} & \dots & -C_2^{X_{L-1}} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ C_L^J & -C_L^{X_1} & \dots & -C_L^{X_{L-1}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 1 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & 1 \end{pmatrix}. \quad (32)$$

Por conveniência, as equações cinéticas partem de uma expressão padrão, sendo necessário apenas fornecer seus coeficientes, incluindo inibições se houver. A expressão adotada é do tipo:

$$v_{(i)} = E n_{(i)} \frac{k_{cat(i)} \cdot \left(X_{(i-1)} - \frac{X_{(i)}}{K_{eq(i)}} \right)}{X_{(i-1)} + k_{m(i)} + \frac{X_{(i)}}{K_{eq(i)}}} \cdot \frac{1}{1 + \frac{X_{(inhib)}}{K_i}}. \quad (33)$$

Com essa forma fixa foi possível manter o programa com o cálculo automático das elasticidades, sem que o usuário precise fornecer as derivadas das equações cinéticas segundo a Equação (9).

Os parâmetros de entrada e saída, bem como suas descrições, estão mostrados na Tabela (6).

Tabela 6 – Parâmetros da função MCA.

Parâmetros de entrada	
<i>Parâmetro</i>	<i>Descrição</i>
o	Escalar que indica qual enzima será superexpressa.
lev	Escalar que indica o nível de superexpressão da enzima.
Parâmetros globais	
<i>Parâmetro</i>	<i>Descrição</i>
s	Nível de substrato.
p	Nível de produto.
En	Vetor contendo todas as constantes cinéticas “En”.
kcat	Vetor contendo todas as constantes cinéticas “kcat”.
Keq	Vetor contendo todas as constantes cinéticas “Keq”.
answ	Parâmetro que recebe os valores 'y' ou 'n', ativando ou desativando os cálculos de inibição.
inhib	Matriz de dimensões ($i \times 2$) onde “i” é o número de inibições. A primeira coluna representa o metabólito que exerce inibição, e a segunda coluna representa a enzima inibida.
Ki	Vetor de dimensão “i” contendo as constantes de inibição “Ki”.
Parâmetros de saída	
<i>Parâmetro</i>	<i>Descrição</i>
xin	Vetor contendo as concentrações de cada metabólito antes de qualquer superexpressão da enzima. O último termo do vetor representa o fluxo no estado estacionário J, também antes de qualquer superexpressão.
Ein	Matriz contendo as elasticidades antes da superexpressão.
Cin	Matriz contendo os coeficientes de controle antes da superexpressão.
x	Vetor contendo as concentrações de cada metabólito após a superexpressão da enzima. O último termo do vetor representa o fluxo no estado estacionário J.
E	Matriz contendo as elasticidades após a superexpressão.
C	Matriz contendo os coeficientes de controle após a superexpressão.
Xstore	É uma matriz que armazena todos os valores de “x” durante o aumento da expressão.
Cstore	É uma matriz que armazena todos os valores de “C” durante o aumento da expressão.
fcst	Confirmação do teorema da soma dos controles de fluxo.
fcct	Confirmação do teorema da conectividade dos controles de fluxo.

Além das matrizes dos FCC's e das elasticidades, o programa ainda fornece gráficos de evolução dos níveis de cada metabólito, do fluxo no estado estacionário J e dos FCC's da via metabólica.

3.1.6. Utilizando o ME Toolbox para MCA de pontos de bifurcação (MCAB)

A função MCAB do toolbox faz a análise de controle metabólico de vias bifurcadas como a exemplificada na Figura (8).

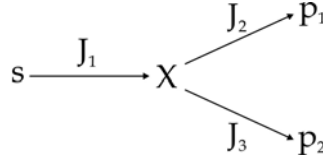


Figura 8 – Exemplo de um ponto de bifurcação em uma via metabólica.

A linha de comando para o uso da função MCAB é a seguinte:

$$[xin, Ein, Cin, x, E, C, Jstore, Xstore, Cstore, XJstore] = \mathbf{MCAB} (J, dep, lev). \quad (34)$$

A função MCAB pode ser usada facilmente em pontos de bifurcação com qualquer número de reações de entrada e de saída.

Como os pontos de bifurcação são relacionados à produção e consumo de um único metabólito, não foi inserido nenhum efeito de inibição deste metabólito sobre qualquer enzima que catalise tais reações. Dessa forma, o modelo cinético utilizado foi a Equação (35), para as reações de produção, e a Equação (36), para as reações de consumo, conforme dado abaixo:

$$v_{(i)} = En_{(i)} \frac{k_{cat(i)} \cdot \left(s_{(i)} - \frac{X}{K_{eq(i)}} \right)}{s_{(i)} + k_{m(i)} + \frac{X_{(i)}}{K_{eq(i)}}}, \quad (35)$$

$$v_{(i)} = En_{(i)} \frac{k_{cat(i)} \cdot \left(X - \frac{p_{(i)}}{K_{eq(i)}} \right)}{X + k_{m(i)} + \frac{p_{(i)}}{K_{eq(i)}}}. \quad (36)$$

Os parâmetros de entrada e saída, bem como suas descrições, estão mostrados na Tabela (7).

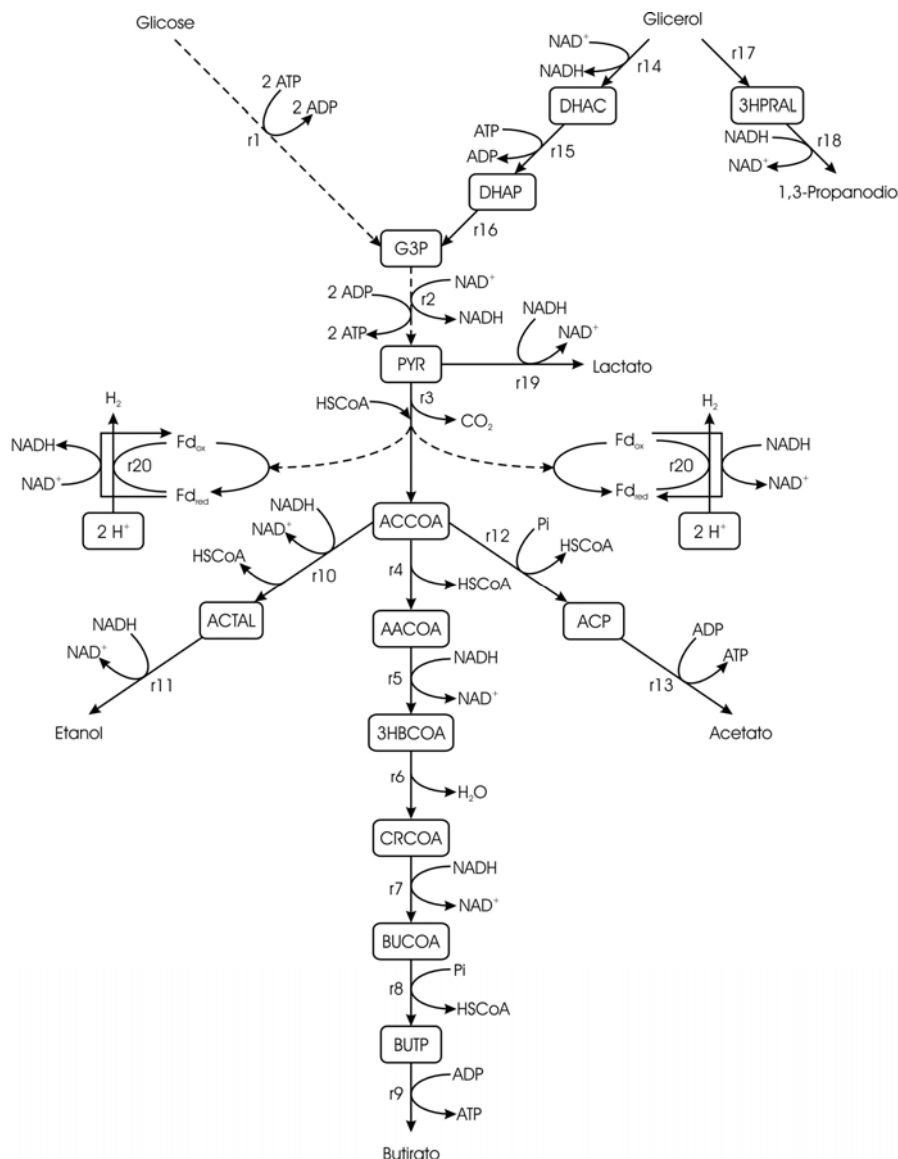
Tabela 7 – Parâmetros da função MCAB.

Parâmetros de entrada	
<i>Parâmetro</i>	<i>Descrição</i>
J	Vetor contendo as taxas de cada um dos fluxos do ponto de bifurcação.
dep	Escalar que indica o fluxo dependente. É o fluxo que será superexpresso.
lev	Escalar que indica o nível de superexpressão da enzima.
Parâmetros globais	
<i>Parâmetro</i>	<i>Descrição</i>
s	Nível de substrato.
p	Nível de produto.
En	Vetor contendo todas as constantes cinéticas “En”.
kcat	Vetor contendo todas as constantes cinéticas “kcat”.
Keq	Vetor contendo todas as constantes cinéticas “Keq”.
Parâmetros de saída	
<i>Parâmetro</i>	<i>Descrição</i>
xin	Vetor contendo a concentração do metabólito e a taxa do fluxo dependente “dep” no estado estacionário, antes de qualquer superexpressão.
Ein	Matriz contendo as elasticidades antes da superexpressão.
Cin	Matriz contendo os coeficientes de controle antes da superexpressão.
x	Vetor contendo a concentração do metabólito e a taxa do fluxo dependente “dep” no estado estacionário, após a superexpressão.
E	Matriz contendo as elasticidades após a superexpressão.
C	Matriz contendo os coeficientes de controle após a superexpressão.
Jstore	É uma matriz que armazena todas as taxas dos fluxos durante o aumento da expressão.
Xstore	É uma matriz que armazena todos os valores de “x” durante o aumento da expressão.
Cstore	É uma matriz que armazena todos os valores de “C” durante o aumento da expressão.
XJstore	É uma matriz que combina “Xstore” com “Jstore”. Usada para facilitar a obtenção de gráficos.

O MCAB gera ainda uma figura com os fluxos do ponto de bifurcação, o nível do metabólito e os FCC's.

3.2. Estudo de caso I: análise de fluxo metabólico para a produção de hidrogênio por *Clostridium butyricum*

O diagrama de fluxos mostrado na Figura (9) mostra um esquema das reações pertinentes à biossíntese de hidrogênio por *Clostridium butyricum* em condições anaeróbicas (Saint-Amans et al., 2001).



Adaptado de Saint-Amans et al., 2001.

Figura 9 – Esquema mostrando o modelo para o metabolismo do hidrogênio. O modelo metabólico apresenta dois substratos, glicose e glicerol, formando gliceraldeído-3-fosfato e gerando etanol, butirato e acetato. A partir do glicerol ainda é formado o 1,3-propanodiol. O hidrogênio é formado pelo sistema lateral onde a ferredoxina (Fd) é oxidada formando H_2 , sendo novamente reduzida pelo piruvato fechando o ciclo.

Todas as reações no modelo estequiométrico são consideradas reversíveis. As setas na Figura (9) representam as direções que são geralmente aceitas. As taxas apresentadas no modelo foram representadas como: taxa de consumo de glicose (v_{Cluc}), taxa de produção de piruvato (v_{Pyr}), taxa de produção de CO_2 (v_{CO2}), taxa de produção de acetoaceil-CoA (v_{AACoA}), taxa de produção de 3-hidroxibutiril-CoA (v_{HbCoA}), taxa de produção de crotonil-

CoA (vCrCoA), taxa de produção de butiril-CoA (vBuCoA), taxa de produção de butiril-fosfato (vButP), taxa de produção de butirato (vBut), taxa de produção de acetaldeído (vActal), taxa de produção de etanol (vEtOH), taxa de produção de acetil-fosfato (vAcP), taxa de produção de acetato (vAct), taxa de consumo de glicerol para produção de dihidroxiacetona (vGlyc1), taxa de produção de dihidroxiacetona-fosfato (vDHAP), taxa de produção de gliceraldeído-3-fosfato pela via do glicerol (vG3P), taxa de consumo de glicerol para produção de 3-Hidroxi-propionaldeído (vGlyc2), taxa de produção de 1,3-propanodiol (v1,3Prd), taxa de produção de lactato (vLac), e taxa de produção de H₂ (vH₂). A partir da via metabólica sugerida (Figura 9), tem-se o conjunto de 20 reações listadas na Tabela (8).

Tabela 8 - Modelo de reações metabólicas para produção de hidrogênio por *Clostridium butyricum*.

#	Fluxo	Reação
r1	vGluc	Glicose + 2ATP → 2ADP + 2Gliceraldeído-3-fosfato
r2	vPyr	Gliceraldeído-3-fosfato + 2ADP + NAD ⁺ → Piruvato + 2ATP + NADH + H ⁺
r3	vCO ₂	Piruvato + HSCoA + NAD ⁺ → Acetil-CoA + NADH + H ⁺ + CO ₂
r4	vAACoA	Acetil-CoA → Acetoacetil-CoA + HSCoA
r5	vHbCoA	Acetoacetil-CoA + NADH + H ⁺ → 3-Hidroxi-butiril-CoA + NAD ⁺
r6	vCrCoA	3-Hidroxi-butiril-CoA → Crotonil-CoA + H ₂ O
r7	vBuCoA	Crotonil-CoA + NADH + H ⁺ → Butiril-CoA + NAD ⁺
r8	vButP	Butiril-CoA + ATP → Butiril-fosfato + HSCoA + ADP
r9	vBut	Butiril-fosfato + ADP → Butirato + ATP
r10	vActal	Acetil-CoA + NADH + H ⁺ → Acetaldeído + HSCoA + NAD ⁺
r11	vEtOH	Acetaldeído + NADH + H ⁺ → Etanol + NAD ⁺
r12	vAcP	Acetil-CoA + ATP → Acetil-fosfato + HSCoA + ADP
r13	vAct	Acetil-fosfato + ADP → Acetato + ATP
r14	vGlyc1	Glicerol + NAD ⁺ → Dihidroxiacetona + NADH + H ⁺
r15	vDHAP	Dihidroxiacetona + ATP → Dihidroxiacetona-fosfato + ADP
r16	vG3P	Dihidroxiacetona-fosfato → Gliceraldeído-3-fosfato
r17	vGlyc2	Glicerol → 3-Hidroxi-propionaldeído
r18	v1,3Prd	3-Hidroxi-propionaldeído + NADH + H ⁺ → 1,3-Propanodiol + NAD ⁺

r19	vLac	Piruvato + NADH + H ⁺ → Lactato + NAD ⁺
r20	vH2	NADH + H ⁺ → NAD ⁺ + H ₂

A representação estequiométrica das reações é dada na Tabela (9) pela matriz **G** de dimensões ($m \times n$) onde m são as 20 reações e n são os 19 metabólitos envolvidos nas reações.

Tabela 9 – Matriz estequiométrica (G) para a via metabólica proposta.

	<i>Gliceraldeído-3-fosfato</i>	<i>Piruvato</i>	<i>HSCoA</i>	<i>Acetil-CoA</i>	<i>Acetoacetil-CoA</i>	<i>3-Hidroxi-butil-CoA</i>	<i>Crotonil-CoA</i>	<i>Butiril-CoA</i>	<i>Butiril-fosfato</i>	<i>Acetaldeído</i>	<i>Acetil-fosfato</i>	<i>Dihidroxiacetona</i>	<i>Dihidroxiacetona-fosfato</i>	<i>3-Hidroxi-propionaldeído</i>	<i>ATP</i>	<i>ADP</i>	<i>NAD+</i>	<i>NADH</i>	<i>H+</i>	
G=	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-2	2	0	0	0	<i>r1</i>
	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	-2	-1	1	1	<i>r2</i>
	0	-1	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	1	<i>r3</i>
	0	0	1	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>r4</i>
	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	-1	<i>r5</i>
	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>r6</i>
	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	-1	<i>r7</i>
	0	0	1	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	<i>r8</i>
	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	<i>r9</i>
	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	-1	-1	<i>r10</i>
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	1	-1	-1	<i>r11</i>
	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	-1	1	0	0	0	<i>r12</i>
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	1	-1	0	0	0	<i>r13</i>
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-1	1	1	<i>r14</i>
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	-1	1	0	0	0	<i>r15</i>
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	<i>r16</i>
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	<i>r17</i>
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	1	-1	-1	<i>r18</i>
	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	-1	<i>r19</i>
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	-1	<i>r20</i>

No modelo estequiométrico proposto, derivado da Figura (9), oito das reações foram classificadas como medidas. Essas foram a taxa de consumo de glicose (vCluc), taxa de produção de CO₂ (vCO₂), taxa de produção de butirato (vBut), taxa de produção de etanol (vEtOH), taxa de produção de acetato (vAct), taxa de consumo de glicerol para produção de dihidroxiacetona

(vGlyc1), taxa de produção de 1,3-propanodiol (v1,3Prd), e taxa de produção de lactato (vLac).

Os fluxos medidos foram obtidos dos experimentos conduzidos por Saint-Amans et al. (2001) e geraram o vetor dos fluxos medidos, $\mathbf{v_m}$, mostrado na Tabela (10).

Tabela 10 – Fluxos medidos para as condições de alimentação com glicose e glicerol.

<i>Taxa específica de formação e consumo (mmol·h⁻¹·g⁻¹[célula seca])</i>		
	<i>Glicose</i>	<i>Glicerol</i>
vGluc	5,72	0,92
vCO2	10,2	6,1
vBut	4	2,87
vEtOH	0,29	0,1
vAct	1,8	0,34
vGlyc	0	15,7
v1,3Prd	0	10,8
vLac	0,81	0,08

Fonte: Saint-Amans et al., 2001.

A taxa de consumo de glicerol, “vGlyc”, é a soma da taxa de consumo de glicerol para produção de dihidroxiacetona (vGlyc1) com a taxa de consumo de glicerol para a produção de 3-hidroxi-propionaldeído (vGlyc2).

Para a análise de fluxo metabólico para produção de hidrogênio, primeiramente foi usada a função MFA do ME Toolbox e, posteriormente, a análise obtida foi usada como confirmação do método usado na função MFAOP, onde o único dado experimental utilizado foi a taxa de consumo de glicerol utilizando glicerol como substrato, “vGlyc1” (Tabela 10).

Além da matriz estequiométrica, “ \mathbf{G} ” (Tabela 9), e do vetor dos fluxos medidos, “ $\mathbf{v_m}$ ” (Tabela 9), os parâmetros de entrada usados na função MFA foram o vetor das posições relativas “ \mathbf{p} ” (Equação 37), e o valor 20 para o parâmetro da posição relativa ao fluxo de maior importância para análise de sensibilidade, “ pcs ”.

$$\mathbf{p} = [1, 3, 9, 11, 13, 14, 18, 19]. \quad (37)$$

As posições indicadas no vetor “**p**” são exatamente os fluxos cujas taxas estão mostradas na Tabela (10). O valor 20 para “*pcs*” significa que a análise de sensibilidade será feita com relação ao fluxo de produção de hidrogênio, vH2 (Tabela 8).

A função MFAOP, usada para confirmação do método e da função objetivo, teve como parâmetros de entrada a mesma matriz estequiométrica “**G**” e o mesmo “*pcs*” usados na função MFA. Foram usados ainda a matriz de posição dos substratos, “**SP**” (Equação 38), o vetor do fluxo experimental, “**EF**” (Equação 39), e a função objetivo “*f*” (Equação 30).

$$SP = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ 2 & 14 \\ 2 & 17 \end{bmatrix}. \quad (38)$$

A matriz de posição dos substratos, “**SP**”, apenas indica quantos substratos existem e de quais fluxos cada um deles participa. No caso da Equação (38), existem dois substratos. O substrato “1”, glicose, participa da reação “1”, e o substrato “2”, glicerol, participa das reações “14” e “17”.

$$EF = [14, 4.9]. \quad (39)$$

O vetor “**EF**” possui o único dado experimental usado nesta função, o “vGlyc1”, que corresponde à reação “14” na matriz estequiométrica (Tabela 9).

Os dados de $\Delta G'_{ox}$ (pH7) foram obtidos de Metzler (1977). Os metabólitos que não tinham sua energia tiveram seus $\Delta G'_{ox}$ estimados pela soma das energias de grupos que os formavam. O $\Delta G'_{ox}$ violaceína, por exemplo, foi estimado pela soma dos $\Delta G'_{ox}$ de duas moléculas de Triptofano. Os valores de $\Delta G'_{ox}$ usados na função objetivo para o caso da *Clostridium butyricum* estão na Tabela (11).

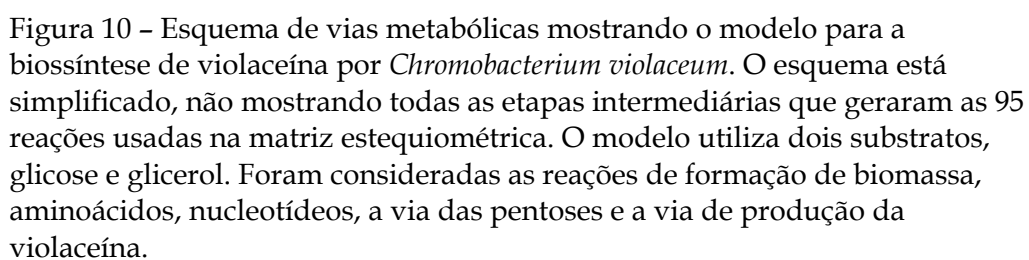
Tabela 11 – Energia livre de oxidação por NAD⁺ a 25°C.

<i>Metabólito</i>	$\Delta G'_{ox}$ (pH7) [kJ · mol ⁻¹]
Gluc	-243,8
CO ₂	0,0
AcCoA	-13,0
H ₂ O	0,0
CrCoA	21,5
But	56,6
EtOH	-4,6
Act	22,1
Glyc	-110,2
1,3Prd	25,3
Lac	-23,9
H ₂	-18,2

Fonte: Metzler, 1977.

3.3. Estudo de caso II: análise de fluxo metabólico para a produção de violaceína por *Chromobacterium violaceum*

Para a análise de fluxo metabólico da violaceína foi usada a função MFAOP do ME Toolbox. A via metabólica modelada foi composta por noventa e cinco reações e noventa e um metabólitos internos, como mostrado na Figura (10) e na Tabela (12).



61

Tabela 12 - Modelo de reações metabólicas para produção de violaceína em *Chromobacterium violaceum*.

#	Reação
r1	<u>GLC</u> + PEP → PYR + G6P
r2	G6P → G1P
r3	G1P + ATP → ADP + PPI + <u>Glicogênio</u>
r4	G6P + NADP → D6PGC + NADPH
r5	D6PGC + NADP → NADPH + CO ₂ + RL5P
r6	RL5P → R5P
r7	RL5P → X5P
r8	R5P + X5P → T3P1 + S7P
r9	T3P1 + S7P → E4P + F6P
r10	X5P + E4P → F6P + T3P1
r11	R5P + ATP → PRPP + AMP
r12	PRPP + ATP → PPI + PRBATP
r13	PRBATP + GLN → PPI + GLU + AICAR + DIMGP
r14	DIMGP → IMACP
r15	IMACP + GLU → AKG + HISOLP
r16	HISOLP + 3 NAD → PI + 3 NADH + <u>HIS</u>
r17	R5P → <u>Nucleotídeos</u>
r18	E4P + PEP → PI + 3DDAH7P
r19	3DDAH7P → DQT + PI
r20	DQT + NADPH → SME + NADP
r21	SME + ATP → ADP + SME5P
r22	SME5P + PEP → 3PSME + PI
r23	3PSME → PI + CHOR
r24	CHOR → PHEN
r25	PHEN → CO ₂ + PHPYR
r26	PHPYR + GLU → AKG + <u>PHE</u>
r27	PHEN + NAD → HPHPYR + CO ₂ + NADH
r28	HPHPYR + GLU → AKG + <u>TYR</u>
r29	CHOR + GLN → GLU + PYR + AN
r30	AN + PRPP → PPI + NPRAN
r31	NPRAN + SER → TRP + T3P1 + CO ₂
r32	TRP + O ₂ → IPYR + NH ₃
r33	TRP + O ₂ → 5HTRP
r34	5HTRP → AIPRO
r35	IPYR + AIPRO → PVIO + 2 CO ₂
r36	PVIO → OIVIO
r37	OIVIO → <u>VIO</u>
r38	1,1/6 G6P + PI → 0,1 H ₂ + 0,1 CO ₂ + <u>Células</u>
r39	G6P → F6P
r40	F6P + ATP → ADP + F16P
r41	F16P → T3P1 + T3P2
r42	<u>GL</u> + ATP → GL3P + ADP
r43	GL3P + FAD → T3P2 + FADH ₂
r44	T3P2 → T3P1

r45	T3P1 + PI + NAD + ADP → NADH + ATP + 3PDGL
r46	3PDGL → PEP
r47	3PDGL + NAD + GLU → NADH + AKG + PI + SER
r48	THF + SER → <u>GLY</u> + METTHF
r49	SER + ACCOA → COA + ASER
r50	ASER + H2S → AC + <u>CYS</u>
r51	PEP + CO2 → OA + PI
r52	PEP + ADP → ATP + PYR
r53	PYR + GLU → AKG + <u>ALA</u>
r54	2 PYR + NADPH → CO2 + NADP + OIVAL
r55	OIVAL + GLU → AKG + <u>VAL</u>
r56	PYR + COA + NAD → NADH + CO2 + ACCOA
r57	ACCOA → <u>AC</u> + COA
r58	ACCOA + OA → COA + CIT
r59	CIT → ICIT
r60	ICIT + NAD → CO2 + NADH + AKG
r61	AKG + NH3 + NADPH → GLU + NADP
r62	AKG + GLN + NADPH → NADP + 2 GLU
r63	GLU + ATP → ADP + GLUP
r64	GLUP + 2 NADPH → <u>PRO</u> + 2 NADP + PI
r65	GLU + NH3 + ATP → GLN + ADP + PI
r66	GLN → <u>Nucleotídeos</u>
r67	GLU + ACCOA → COA + NAGLU
r68	NAGLU + ATP + NADPH + GLU → ORN + ADP + NADP + PI + AKG + AC
r69	ORN → PTRSC + CO2
r70	PTRSC + DSAM → <u>SPRMD</u> + 5MTA
r71	GLN + 2 ATP + CO2 → GLU + CAP + 2 ADP + PI
r72	ORN + CAP + ASP + ATP → ARG + FUM + PI + AMP + PPI
r73	AKG + NAD + COA → CO2 + NADH + SUCCOA
r74	SUCCOA + GDP + PI → GTP + COA + SUCC
r75	SUCC + FAD → FADH2 + FUM
r76	FUM → MAL
r77	MAL + NAD → NADH + OA
r78	OA + GLU → ASP + AKG
r79	ASP + ATP + NADPH → ASPSA + ADP + PI + NADP
r80	ASPSA + NADPH → NADP + HSER
r81	HSER + ATP → THR + ADP + PI
r82	THR → NH3 + OBUT
r83	OBUT + PYR + GLU + NADPH → CO2 + NADP + AKG + <u>ILE</u>
r84	HSER + SUCCOA + CYS → COA + SUCC + HCYS + PYR + NH3
r85	HCYS + MTHF → <u>MET</u> + THF
r86	ASPSA + PYR → D23PIC
r87	D23PIC + NADPH → NADP + PIP26DX
r88	PIP26DX + SUCCOA + GLU → COA + AKG + SUCC + D26PIM
r89	D26PIM → CO2 + <u>LYS</u>
r90	ASP + ATP + GLN → GLU + <u>ASN</u> + AMP + PPI
r91	ASP + ATP + NH3 → <u>ASN</u> + AMP + PPI
r92	MAL + NADP → CO2 + NADPH + PYR
r93	MAL + NAD → CO2 + NADH + PYR

r94	ICIT → GLX + SUCC
r95	ACCOA + GLX → COA + MAL

Neste conjunto de reações estão considerados não só o metabolismo central como também a via das pentoses, formação de nucleotídeos, formação de aminoácidos e produção de violaceína.

Diferente da análise de fluxo metabólico para a produção biológica de hidrogênio, a análise de fluxo metabólico da violaceína não continha dados experimentais e teve de ser estimada com o uso de programação linear mediante uma função objetivo, para tanto, utilizou-se o valor “1” para a taxa de consumo de glicose (Equação 41).

Os parâmetros de estrada usados na função MFAOP foram a matriz estequiométrica “**G**”, originária das reações presentes na Tabela (12), o valor 37 para o parâmetro “**pcs**”, que indica o fluxo de violaceína para a análise de sensibilidade, a matriz das posições relativas dos substratos, “**SP**” (Equação 40), o vetor do fluxo experimental, “**EF**” (Equação 41), e a função objetivo “**f**” (Equação 30).

$$SP = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ & 2 \end{bmatrix} 42, \quad (40)$$

$$EF = [1, 1]. \quad (41)$$

Os valores de $\Delta G'_{ox}$ usados na função objetivo para o caso da *Chromobacterium violaceum* estão na Tabela (13).

Tabela 13 – Energia livre de oxidação por NAD⁺ a 25°C (Metzler, 1977).

Metabólito	$\Delta G'_{ox}$ (pH7) [kJ · mol ⁻¹]
Glc	-243,8
Gl	-110,2
Glicogênio	-258,6
His	12,1
Nucleotídeos	-301,65
Phe	23,4
Tyr	23,4
Vio	-603,4
H2	-18,2
Cys	121,5

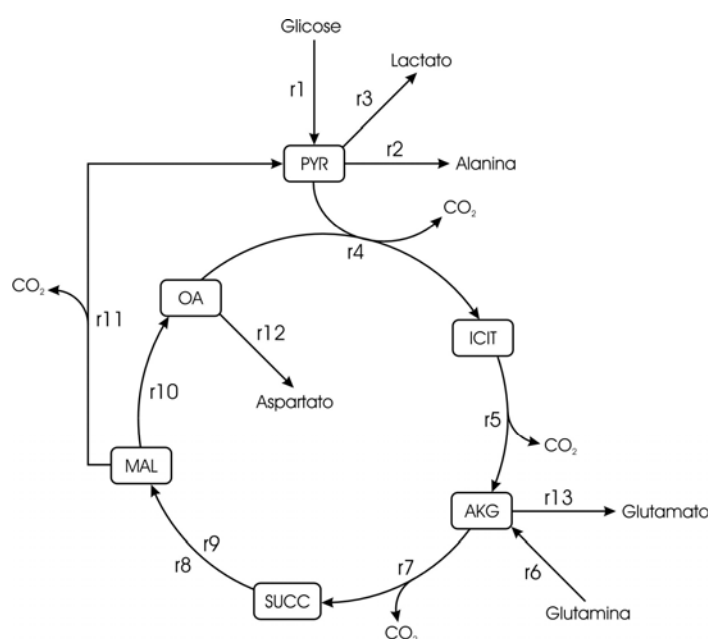
...continuação

Gly	-22,6
Ac	22,1
Ala	0,8
Val	40,5
Pro	25,1
Sprmd	-289,1
Ile	62,3
Met	123,45
Lys	-4,7
Asn	-28,4

Fonte: Metzler, 1977.

3.4. Estudo de caso III: análise de fluxo metabólico para um modelo simplificado do metabolismo central de uma célula animal

Para mostrar o funcionamento da função MFAIL do ME Toolbox, foi usado o exemplo apresentado por Nielsen (2001), uma via metabólica simplificada para o metabolismo central (Figura 11).



Adaptado de Nielsen (2001).

Figura 11 – Esquema mostrando o modelo simplificado para o metabolismo central de uma célula animal.

As reações da via metabólica, bem como a passagem dos carbonos em cada reação, estão mostradas na Tabela (14).

Tabela 14 – Modelo de reações metabólicas para o metabolismo central simplificado.

#	Reação	
r1	Glicose	→ PYR #ABC
r2	PYR #ABC	→ Alanina #ABC
r3	PYR #ABC	→ Lactato #ABC
r4	PYR #ABC	+ OA #abcd → ICIT #dcbaCB + CO ₂ #A
r5	ICIT #ABCDEF	→ AKG #ABCEF + CO ₂ #D
r6	Glutamina	→ AKG #ABCDE
r7	AKG #ABCDE	→ SUCC #BCDE + CO ₂ #A
r8	SUCC #ABCD	→ MAL #ABCD
r9	SUCC #ABCD	→ MAL #DCBA
r10	MAL #ABCD	→ OA #ABCD
r11	MAL #ABCD	→ PYR #ABC + CO ₂ #D
r12	OA #ABCD	→ Aspartato #ABCD
r13	AKG #ABCDE	→ GLU #ABCDE

No problema proposto por Nielsen (2001), as taxas dos fluxos 8 e 9 são idênticos. As reações da Tabela (14), mais a equação adicional $v_8 = v_9$, geram a seguinte matriz estequiométrica:

$$\mathbf{G} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & -1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 1 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}. \quad (42)$$

Os parâmetros de entrada usados na função MFAIL foram a matriz estequiométrica “**G**”, o vetor dos fluxos medidos “**vm**” (Equação 43) e o vetor das posições relativas dos fluxos “**p**” (Equação 40).

$$\text{vm} = [100;15;80;40;5;10], \quad (43)$$

$$\text{p} = [1,2,3,6,12,13]. \quad (44)$$

A função MFAIL é a única função do ME Toolbox que precisa ser ajustada ao problema do usuário. Além das matrizes de mapeamento atômico, geradas a partir da função auxiliar AMM (ver seção 3.1), o usuário precisa entender o sistema linear gerado pelo balanço carbono a carbono, e modificá-lo para um novo problema mais complexo. Para o problema proposto, as equações dos balanços carbono a carbono são as seguintes (Equações 45 a 52):

$$v_1 \cdot ([Glucose > Pyr] \cdot \mathbf{x}^{Glic}) + v_{11} \cdot ([Mal > Pyr] \cdot \mathbf{x}^{Mal}) - (v_2 + v_3 + v_4) \cdot \mathbf{I}_{3 \times 3} \cdot \mathbf{x}^{Pyr} = \mathbf{0}, \quad (45)$$

$$-(v_2 + v_3 + v_4) \cdot \mathbf{I}_{3 \times 3} \cdot \mathbf{x}^{Pyr} + v_{11} \cdot ([Mal > Pyr] \cdot \mathbf{x}^{Mal}) = -v_1 \cdot \mathbf{x}^{Pyr,in}, \quad (46)$$

$$v_4 \cdot ([Pyr > ICit] \cdot \mathbf{x}^{Pyr} + [OA > ICit] \cdot \mathbf{x}^{OA}) - v_5 \cdot \mathbf{I}_{6 \times 6} \cdot \mathbf{x}^{ICit} = \mathbf{0}, \quad (47)$$

$$v_5 \cdot ([ICit > AKG] \cdot \mathbf{x}^{ICit}) + v_6 \cdot ([Glutamina > AKG] \cdot \mathbf{x}^{Glut}) - (v_7 + v_{13}) \cdot \mathbf{I}_{5 \times 5} \cdot \mathbf{x}^{AKG} = \mathbf{0}, \quad (48)$$

$$v_5 \cdot ([ICit > AKG] \cdot \mathbf{x}^{ICit}) - (v_7 + v_{13}) \cdot \mathbf{I}_{5 \times 5} \cdot \mathbf{x}^{AKG} = -v_6 \cdot \mathbf{x}^{AKG,in}, \quad (49)$$

$$v_7 \cdot ([AKG > Suc] \cdot \mathbf{x}^{AKG}) - (v_8 + v_9) \cdot \mathbf{I}_{4 \times 4} \cdot \mathbf{x}^{Suc} = \mathbf{0}, \quad (50)$$

$$v_8 \cdot ([Suc > Mal8] \cdot \mathbf{x}^{Suc}) + v_9 \cdot ([Suc > Mal9] \cdot \mathbf{x}^{Suc}) - (v_{10} + v_{11}) \cdot \mathbf{I}_{4 \times 4} \cdot \mathbf{x}^{Mal} = \mathbf{0}, \quad (51)$$

$$v_{10} \cdot ([Mal > OA] \cdot \mathbf{x}^{Mal}) - (v_4 + v_{12}) \cdot \mathbf{I}_{4 \times 4} \cdot \mathbf{x}^{OA} = \mathbf{0}. \quad (52)$$

Para serem usadas na função MFAIL, as equações dos balanços carbono a carbono precisam estar na forma matricial (Equação 53).

$$\begin{pmatrix} -(v_2 + v_3 + v_4) \cdot \mathbf{I}_{3 \times 3} & \mathbf{0}_{3 \times 6} & \mathbf{0}_{3 \times 5} & \mathbf{0}_{3 \times 4} & v_{11} \cdot [Mal > Pyr] & \mathbf{0}_{3 \times 4} \\ v_4 \cdot [Pyr > ICit] & -v_5 \cdot \mathbf{I}_{6 \times 6} & \mathbf{0}_{6 \times 5} & \mathbf{0}_{6 \times 4} & \mathbf{0}_{6 \times 4} & v_4 \cdot [OA > ICit] \\ \mathbf{0}_{5 \times 3} & v_5 \cdot [ICit > AKG] & -(v_7 + v_{13}) \cdot \mathbf{I}_{5 \times 5} & \mathbf{0}_{5 \times 4} & \mathbf{0}_{5 \times 4} & \mathbf{0}_{5 \times 4} \\ \mathbf{0}_{4 \times 3} & \mathbf{0}_{4 \times 6} & v_7 \cdot [AKG > Suc] & -(v_8 + v_9) \cdot \mathbf{I}_{4 \times 4} & \mathbf{0}_{4 \times 4} & \mathbf{0}_{4 \times 4} \\ \mathbf{0}_{4 \times 3} & \mathbf{0}_{4 \times 6} & \mathbf{0}_{4 \times 5} & v_8 \cdot [Suc > Mal8] + v_9 \cdot [Suc > Mal9] & -(v_{10} + v_{11}) \cdot \mathbf{I}_{4 \times 4} & \mathbf{0}_{4 \times 4} \\ \mathbf{0}_{4 \times 3} & \mathbf{0}_{4 \times 6} & \mathbf{0}_{4 \times 5} & \mathbf{0}_{4 \times 4} & v_{10} \cdot [Mal > OA] & -(v_4 + v_{12}) \cdot \mathbf{I}_{4 \times 4} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \mathbf{x}^{Pyr} \\ \mathbf{x}^{ICit} \\ \mathbf{x}^{AKG} \\ \mathbf{x}^{Suc} \\ \mathbf{x}^{Mal} \\ \mathbf{x}^{OA} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -v_1 \cdot \mathbf{x}^{Pyr,in} \\ \mathbf{0}_{6 \times 1} \\ -v_6 \cdot \mathbf{x}^{AKG,in} \\ \mathbf{0}_{4 \times 1} \\ \mathbf{0}_{4 \times 1} \\ \mathbf{0}_{4 \times 1} \end{pmatrix}. \quad (53)$$

$\mathbf{x}^{Pyr,in}$ e $\mathbf{x}^{AKG,in}$ são vetores que mostram qual dos carbonos está marcado, proveniente dos substratos glicose e glutamina, respectivamente (Equação 54).

$$\begin{aligned} \mathbf{x}_{\text{pyr_in}} &= [0;0;1], \\ \mathbf{x}_{\text{akg_in}} &= [0;0;0;0;0]. \end{aligned} \tag{54}$$

No exemplo mostrado na Equação (54), o piruvato possui seu terceiro carbono marcado. Cada estado de marcação inicial gera uma resposta nos estados de marcação dos produtos, que podem ser observados pelos vetores \mathbf{x}^{Pyr} , \mathbf{x}^{ICit} , \mathbf{x}^{AKG} , \mathbf{x}^{Suc} , \mathbf{x}^{Mal} , \mathbf{x}^{OA} .

CAPÍTULO IV

Resultados e Discussão

4.1. Estudo de caso I: análise de fluxo metabólico para a produção de hidrogênio por *Clostridium butyricum*

Utilizando os dados mencionados em materiais e métodos, a análise de fluxo metabólico objetivando a produção de hidrogênio foi executada. As funções utilizadas foram a MFA, para análise de fluxo metabólico convencional, e a MFAOP, para validar o método usado nesta função.

4.1.1. Classificação do sistema

O “rank” da matriz de redundância é 4, que define o número de equações linearmente dependentes em **R**. Como o número de equações de balanço de massa foi $m = 20$, o número de fluxos não medidos é $c = 12$ e $m - c = 20 - 12 = 8 >$ “rank” da matriz de redundância, tem-se mais fluxos do que o necessário para o sistema, caracterizando um sistema superdeterminado.

4.1.2. Estimativa dos fluxos não medidos da rede metabólica no regime estacionário

O sistema de equações obtido a partir das reações foi resolvido utilizando a Equação (6) para alimentação com glicose (Figura 12).

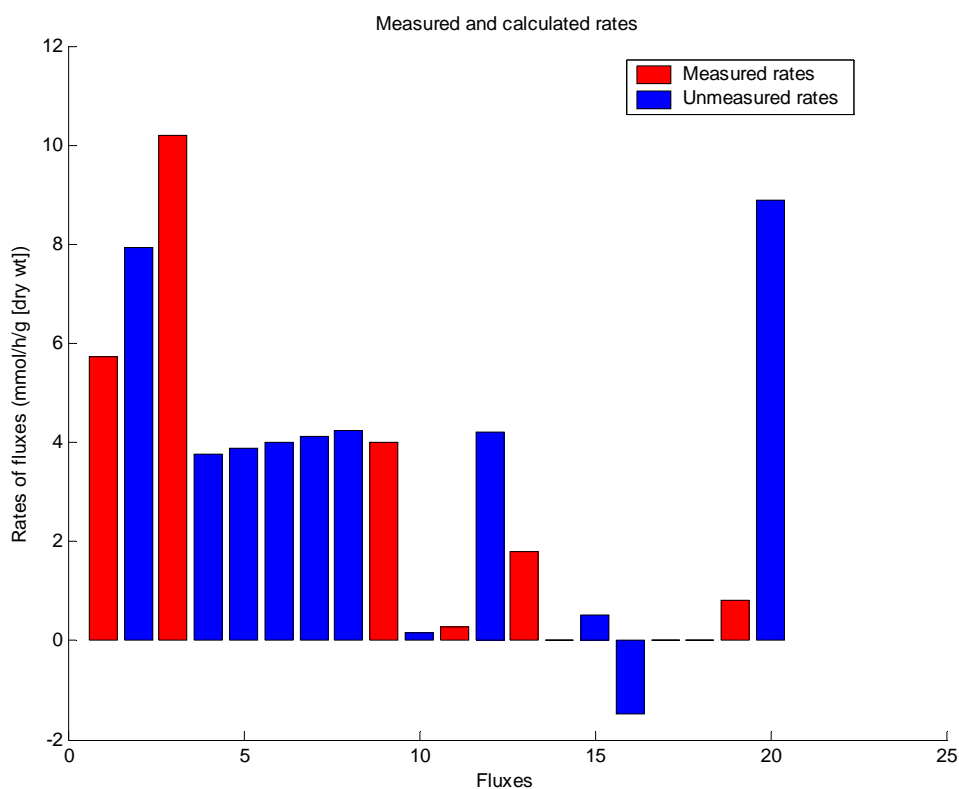


Figura 12 – Fluxos obtidos por balanço de massa simples para a rede de reações em estudo e alimentação com glicose. Gráfico de saída do ME Toolbox.

A taxa de produção de H_2 (v_{H_2}) foi de $8,9 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ [célula seca], que têm boa aproximação com o valor $11,3 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ [célula seca] obtido por Saint-Amans et al. (2001), visto que a rede de reações modelada é a principal via de produção de hidrogênio, mas não é a única (Hallenbeck e Benemann, 2002).

Fazendo os mesmos cálculos para alimentação com glicerol, chega-se a um novo conjunto de fluxos que mostram a forte tendência da *Clostridium butyricum* em usar o glicerol para produzir 1,3-propanodiol, em detrimento da produção de hidrogênio (Figura 13).

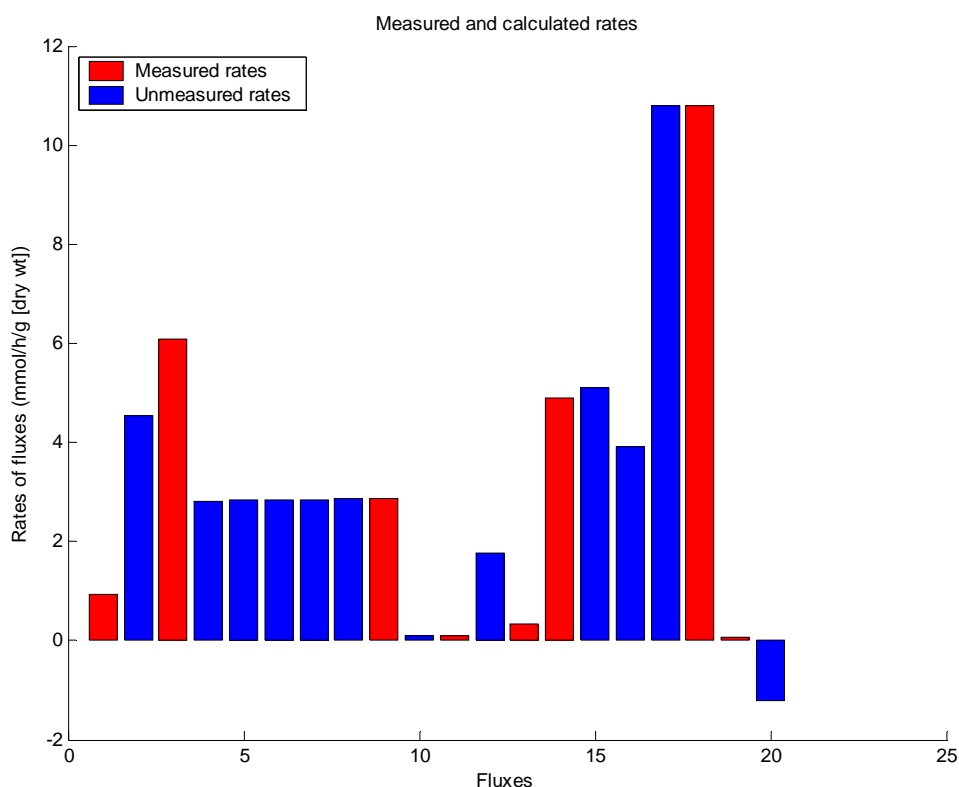


Figura 13 – Fluxos obtidos por balanço de massa simples para a rede de reações em estudo e alimentação com glicerol. Gráfico de saída do ME Toolbox.

Novamente comparando com os dados experimentais obtidos pelo grupo de Saint-Amans, o fluxo de hidrogênio obtido no modelo foi $-1,22 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}[\text{célula seca}]$ contra $0,39 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}[\text{célula seca}]$ do fluxo experimental, mantendo uma diferença de aproximadamente $2 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}[\text{célula seca}]$ para produção de hidrogênio teórica e experimental em ambas condições de alimentação. Tal diferença provavelmente está relacionada a simplicidade do modelo utilizado, gerando alguns dados que não correspondem a realidade, como por exemplo, um fluxo negativo de hidrogênio.

4.1.3. Melhoramento estatístico das medidas

O resíduo “ ε ” foi 3,18 para alimentação com glicose e 2,42 com glicerol, gerando uma função teste “ h ” de 5,02 e 2,91, respectivamente. Isso mostra que a

função teste é menor que o valor correspondente à distribuição χ^2 com quatro graus de liberdade, mesmo para baixos graus de confiança. Novas estimativas para os fluxos medidos foram então obtidas com o uso da Equação (16) (Tabela 15).

Tabela 15 – Fluxos medidos para as condições de alimentação com glicose e glicerol (Sait-Amans et al., 2000), e as novas estimativas obtidas pelo melhoramento estatístico.

<i>Taxa específica de formação e consumo (mmol·h⁻¹·g⁻¹[célula seca])</i>				
	<i>Glicose</i>		<i>Glicerol</i>	
	<i>Antigos</i>	<i>Novos</i>	<i>Antigos</i>	<i>Novos</i>
vGluc	5,72	4,13	0,92	-0,29
vCO ₂	10,2	10,82	6,1	6,57
vBut	4	3,16	2,87	2,23
vEtOH	0,29	0,49	0,1	0,26
vAct	1,8	2,00	0,34	0,50
vGlyc	0	-0,80	15,7	15,09
v1,3Prd	0	0	10,8	10,8
vLac	0,81	1,64	0,08	0,71

A partir dessas novas medidas, novos fluxos não medidos foram obtidos tanto para alimentação com glicose quanto para glicerol (Figuras 14 e 15).

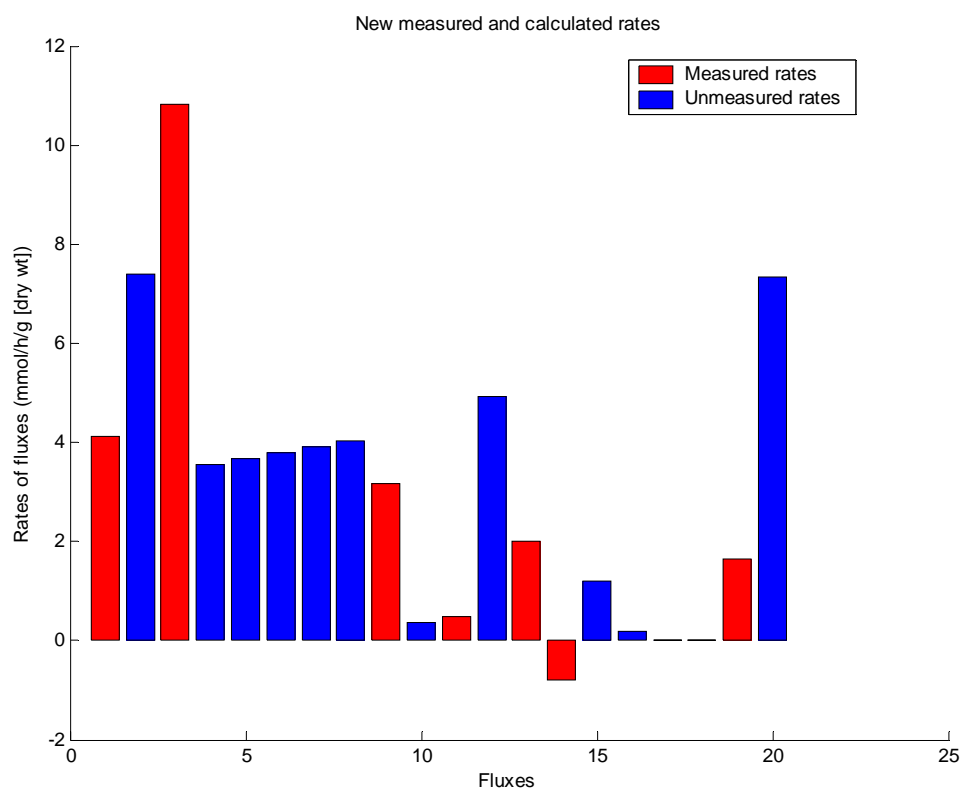


Figura 14 – Novos fluxos obtidos por balanço de massa e melhoramento estatístico para a rede de reações em estudo e alimentação com glicose. Gráfico de saída do ME Toolbox.

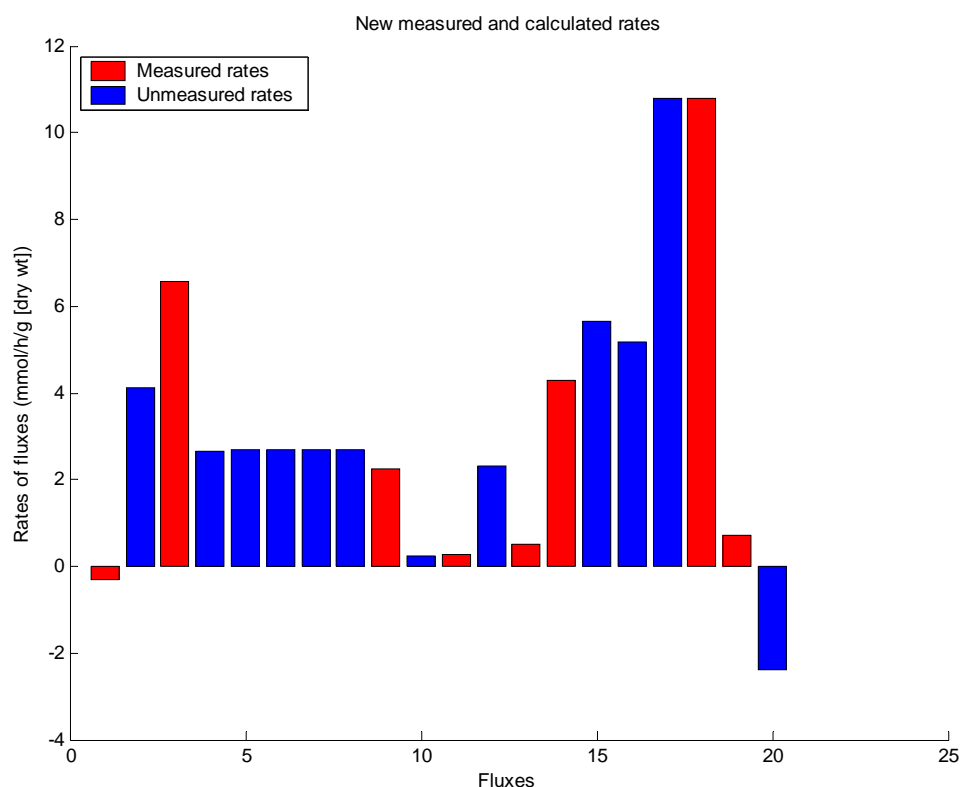


Figura 15 – Novos fluxos obtidos por balanço de massa e melhoramento estatístico para a rede de reações em estudo e alimentação com glicerol. Gráfico de saída do ME Toolbox.

A diferença entre o fluxo experimental da produção de hidrogênio e o teórico obtido por análise de fluxo metabólico aumentou com o melhoramento estatístico das medidas.

4.1.4. Análise de sensibilidade

O número condicional “C” obtido a partir da Equação (17) foi 30. O valor está entre 1 e 100, refletindo um sistema bem condicionado com pouca propagação de erros. A Tabela (16) mostra os valores das sensibilidades dos fluxos calculados em relação a variações nos fluxos medidos, determinadas pela Equação (18). Os valores que estão em “Acumulado” são os somatórios dos módulos das sensibilidades, que indicam os fluxos cuja variação tem maior impacto sobre toda a via metabólica.

Tabela 16 – Sensibilidade dos fluxos calculados em relação a variações nos fluxos medidos.

	vGluc	vCO2	vBut	vEtOH	vAct	vGlyc1	v1,3Prd	vLac
vPyr	0,6415	0,467	-0,1651	-0,0708	-0,0708	0,3208	0	0,3962
vAACoA	0,066	0,4929	-0,0354	-0,658	-0,658	0,033	0	-0,1651
vHbCoA	0,0377	0,4245	0,1226	-0,5189	-0,5189	0,0189	0	-0,0943
vCrCoA	0,0094	0,3561	0,2807	-0,3797	-0,3797	0,0047	0	-0,0236
vBuCoA	-0,0189	0,2877	0,4387	-0,2406	-0,2406	-0,0094	0	0,0472
vButP	-0,0472	0,2193	0,5967	-0,1014	-0,1014	-0,0236	0	0,1179
vActal	0,0283	0,0684	-0,158	0,8608	-0,1392	0,0142	0	-0,0708
vAcP	-0,0849	0,2948	-0,0259	-0,0825	0,9175	-0,0425	0	0,2123
vDHAP	-0,5283	0,3066	0,033	0,0142	0,0142	0,7358	0	0,3208
vG3P	-0,9434	0,3868	-0,066	-0,0283	-0,0283	0,5283	0	0,3585
vGlyc2	0	0	0	0	0	0	1	0
vH2	0,5943	0,6863	-0,5684	-1,1722	0,8278	1,2972	-1	-0,4858
Acumulado	2,9999	3,9904	2,4905	4,1274	3,8964	3,0284	2	2,2925

Analisando a sensibilidade de todo o sistema, as variações no fluxo de produção de etanol, “r11”, são as que têm o maior impacto sobre os fluxos calculados (Figura 16). Cabe ressaltar que apenas os fluxos medidos possuem valores de sensibilidade na Figura (16), pois é com relação a eles que tais valores são calculados (Tabela 16).

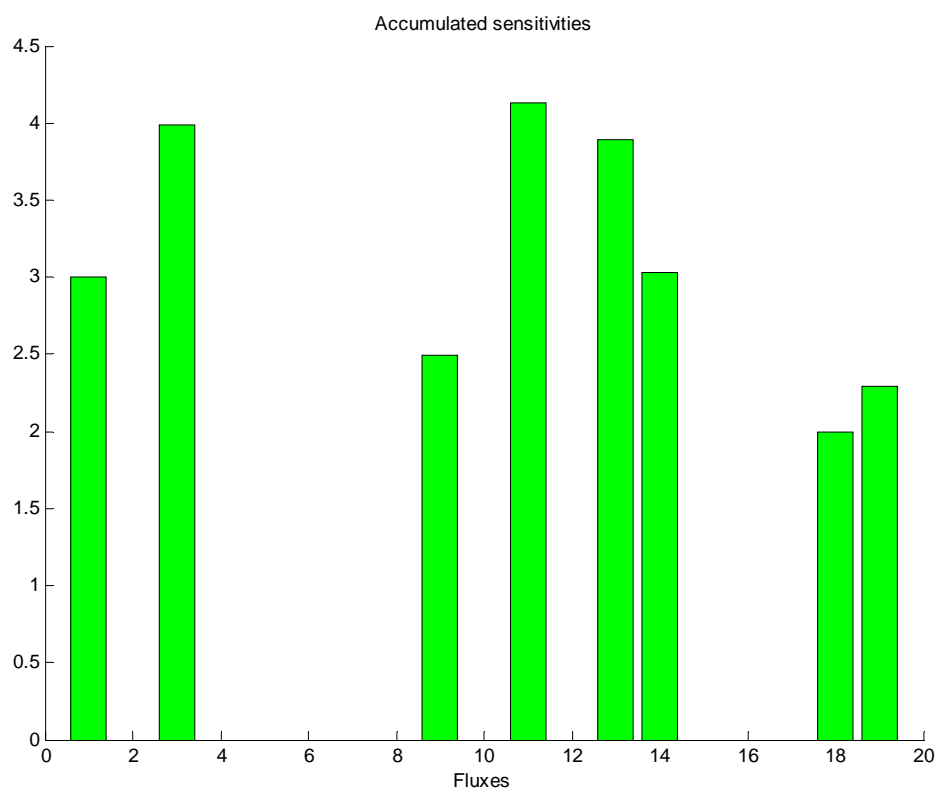


Figura 16 – Sensibilidade acumulada para todos os fluxos medidos. Gráfico de saída do ME Toolbox.

Como a reação de interesse é a produção do hidrogênio, analisou-se a sensibilidade apenas para esse fluxo e concluiu-se que o fluxo medido de maior impacto para produção de hidrogênio é o consumo de glicerol para produção de dihidroxiacetona, “r14” (Figura 17).

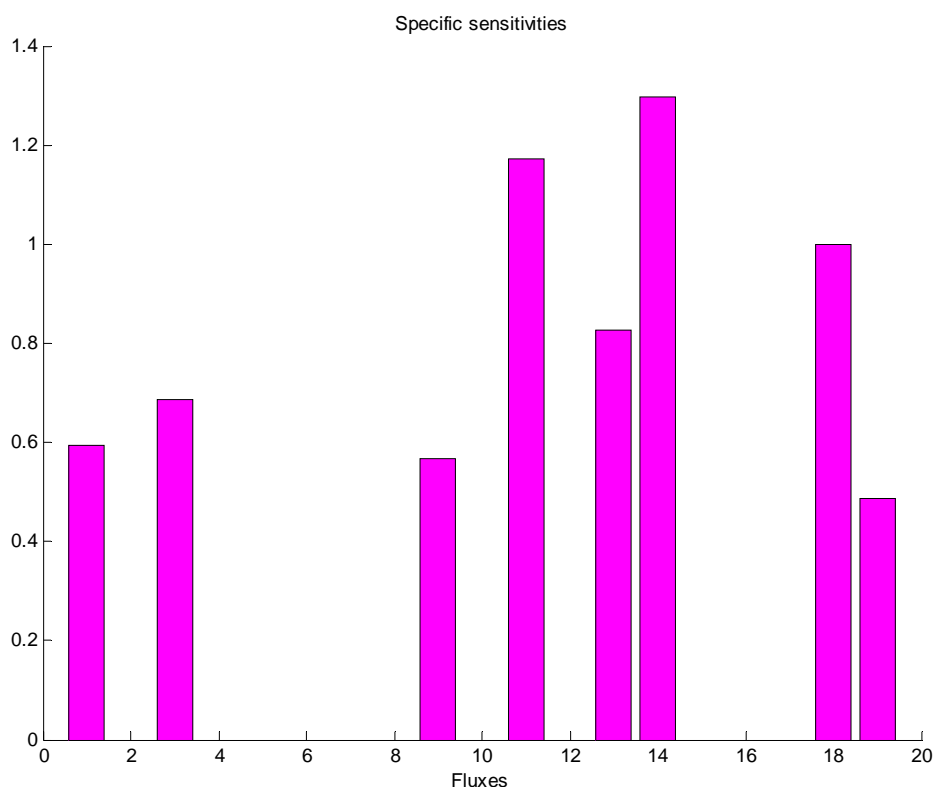


Figura 17 – Sensibilidade do fluxo de H_2 a variações nos fluxos medidos. Gráfico de saída do ME Toolbox.

Infelizmente, a maior parte do glicerol alimentado seria usada para produção de 1,3-propanodiol. O segundo fluxo mais importante é a produção de etanol, porém a *Clostridium butyricum* possui uma produção muito baixa de etanol (Saint-Amans et al. 2001). Desta forma, reduzir ainda mais esse fluxo não traria grande contribuição para produção de hidrogênio. O fluxo que apresenta o terceiro maior impacto para produção do hidrogênio foi a produção de 1,3-propanodiol. Este fluxo pode gerar a melhor estratégia para a obtenção de uma *Clostridium butyricum* super-produtora de hidrogênio, uma vez que a deleção desta via permitiria o uso de glicerol como substrato. Segundo a análise de sensibilidade, a deleção do gene produtor da enzima glicerol desidratase, responsável pela via de produção de 1,3-propanodiol, combinado com a alimentação com glicerol, é a tática de manipulação genética mais eficiente para a produção de hidrogênio.

4.1.5. Validação da hipótese de minimização do gasto energético. Análise de fluxo metabólico para produção de hidrogênio usando a função MFAOP

Com o objetivo de validar a metodologia usada na função MFAOP, função que determina a análise de fluxo metabólico para sistemas subdeterminados no ME Toolbox.

Como foi dito anteriormente, a hipótese utilizada como objetivo celular foi a minimização do gasto energético (Equação 30). Todos os fluxos, intracelulares e extracelulares, foram estimados usando a função MFAOP, e os resultados foram muito semelhantes aos obtidos pela análise de fluxo metabólico para um sistema superdeterminado (Figura 18).

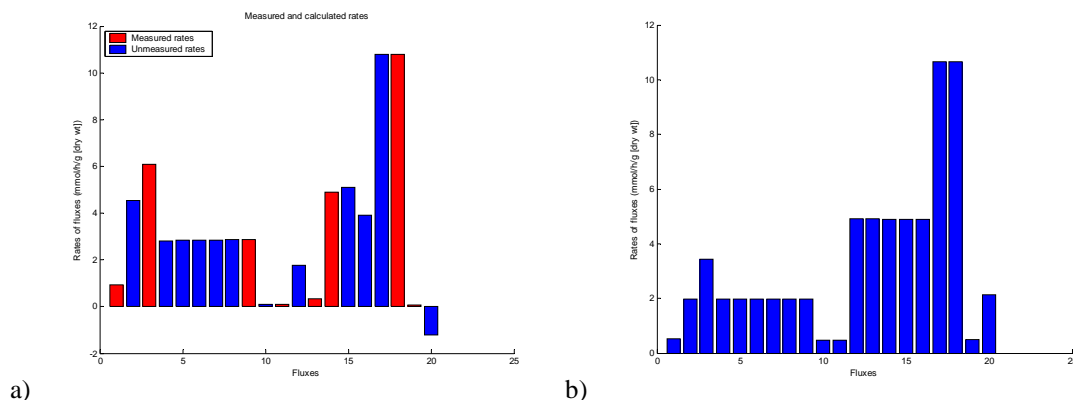


Figura 18 – Comparação entre os fluxos obtidos pela função MFA (a) e os estimados pela função MFAOP (b). Gráficos de saída do ME Toolbox.

Tal resultado valida a hipótese de minimização do gasto energético, bem como a metodologia utilizada para a construção da função objetivo.

Como a análise de sensibilidade independe de dados experimentais, o MFAOP seleciona automaticamente os fluxos extracelulares através da função objetivo (Figura 19).

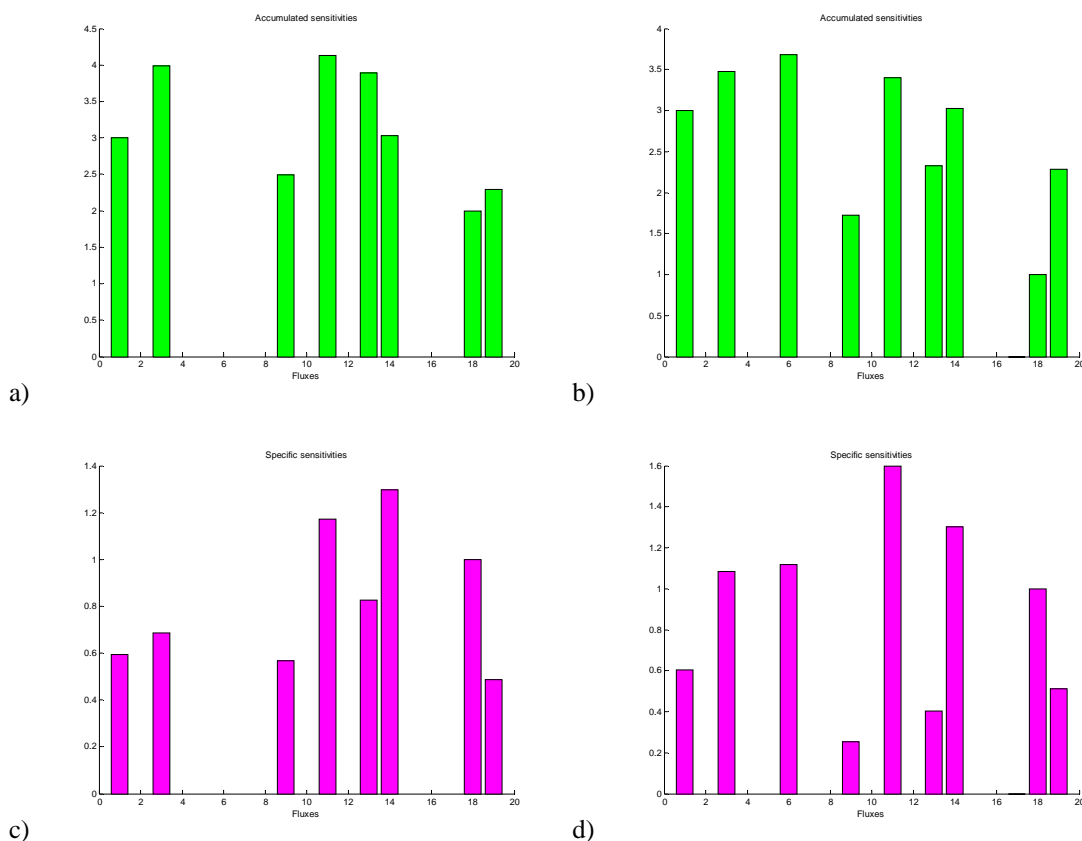


Figura 19 – Comparação entre as sensibilidades acumuladas (a e b), e do H₂ (c e d), obtidas pela função MFA (a e c) e as obtidas pela função MFAOP (b e d). Gráficos de saída do ME Toolbox.

Apesar de usar a mesma metodologia, as análises de sensibilidade foram diferentes. Por exemplo, utilizando a função MFA, o fluxo de maior impacto para a produção de hidrogênio foi o consumo de glicerol para a produção de dihidroxiacetona, “r14”, enquanto na função MFAOP, o fluxo de maior impacto para a produção de hidrogênio foi a reação de produção de etanol, “r11”. A diferença entre as análises de sensibilidade tem uma explicação simples. A função MFA calcula as sensibilidades apenas com relação aos fluxos medidos, enquanto a função MFAOP seleciona todos os fluxos extracelulares, a partir dos dados contidos na função objetivo. Com isso, a função MFAOP computou também os fluxos 6 e 17. Pode-se dizer que, para a análise de sensibilidade, a MFAOP é mais correta.

Segundo as sensibilidades obtidas pelo MFAOP, o fluxo que possui o maior impacto sobre a produção de hidrogênio é o do etanol, “r11”, seguido

pelo consumo de glicerol para produção de dihidroxiacetona, “r14”. Como foi dito anteriormente, a *Clostridium butyricum* tem uma produção de etanol bem próxima de zero, tornando ineficiente qualquer deleção nessa via. Portanto, as hipóteses mencionadas anteriormente para a obtenção de uma *C. butyricum* super-produtora de hidrogênio ainda continuam válidas quando a função MFAOP é utilizada.

Validada a hipótese de minimização do gasto energético, utilizou-se o mesmo procedimento para a análise de fluxo metabólico para a produção de violaceína por *Chromobacterium violaceum*.

4.2. Estudo de caso II: análise de fluxo metabólico para a produção de violaceína por *Chromobacterium violaceum*

Comprovada a eficácia da função MFAOP, os dados mencionados em materiais e métodos foram utilizados para fazer a análise de fluxo metabólico para produção de violaceína. Todas as taxas dos 95 fluxos modelados para a *C. violaceum* foram obtidas por programação linear a partir da função objetivo de minimização do gasto energético (Figura 20).

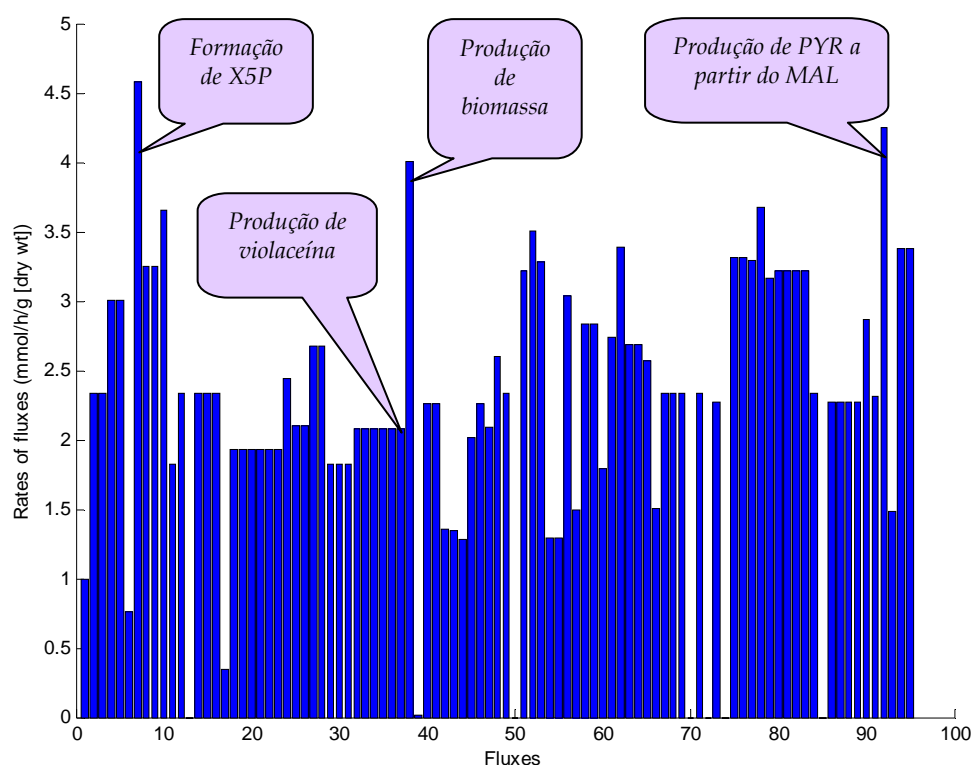


Figura 20 – Fluxos da *Chromobacterium violaceum* obtidos por otimização linear usando a minimização do gasto energético como função objetivo. Os fluxos estão classificados de acordo com a Tabela (12). Gráfico de saída do ME Toolbox.

Analisando as sensibilidades acumuladas, pode-se observar que as reações de produção de metionina e valina são as que causam maior impacto na via metabólica como um todo, isto é, são as reações cujas variações têm maior influência sobre toda a via (Figura 21).

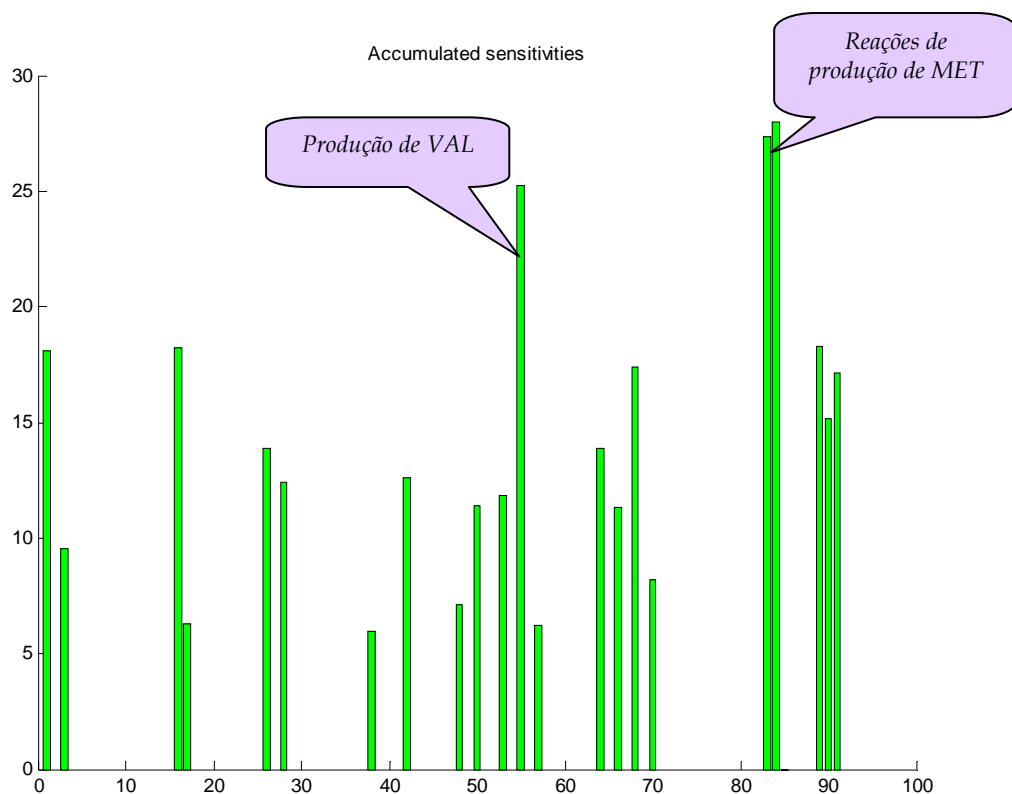


Figura 21 – Sensibilidade acumulada para todos os fluxos extracelulares. Gráfico de saída do ME Toolbox.

Analisando as sensibilidades relacionadas apenas a produção de violaceína, a reação de produção de cisteína é o fluxo de maior influência, seguida pela reação de produção de isoleucina. Isso significa que a produção de violaceína provavelmente terá uma grande resposta a pequenas variações nessas reações (Figura 22).

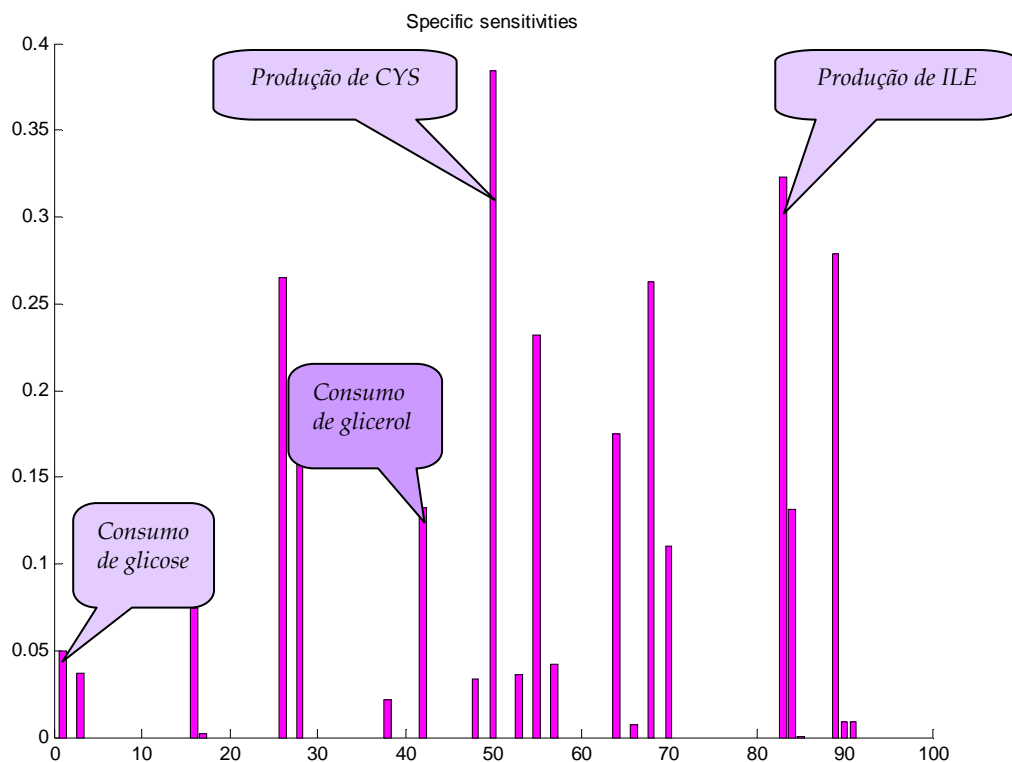


Figura 22 – Sensibilidade do fluxo de violaceína a variações nos fluxos extracelulares. Gráfico de saída do ME Toolbox.

Um resultado interessante, que havia sido comprovado experimentalmente por Oliveira (2005), foi a influência dos substratos glicose e glicerol sobre a produção de violaceína. A análise de sensibilidade prevê que a *C. violaceum* produz mais violaceína quando alimentada com glicerol, pois este fluxo possui uma sensibilidade muito maior que o fluxo de glicose. Tal evidência vai contra a hipótese de inibição gênica da glicose, proposta por Oliveira (2005). A análise de sensibilidade, apesar de não conter todas as reações existentes em *C. violaceum*, comprova que o fato de a *C. violaceum* produzir muito mais violaceína quando alimentada com glicerol é principalmente uma questão metabólica. Segundo a análise de sensibilidade, o glicerol exerce uma resposta sobre a produção de violaceína superior ao dobro da obtida com glicose. A análise de sensibilidade fornece ainda uma estratégia que seria a mais eficiente para uma possível mutação genética, a inibição do gene responsável pela reação de produção de isoleucina, visto que a produção

de cisteína, reação que teve a maior sensibilidade, apresentou taxa de reação nula.

4.3. Estudo de caso III: análise de fluxo metabólico para um modelo simplificado do metabolismo central de uma célula animal

Como foi dito em materiais e métodos, o uso da função MFAIL foi exemplificado com o exemplo simplificado do metabolismo central de uma célula animal (Nielsen, 2001). A primeira resposta da função MFAIL é a mesma obtida pelo MFA, os fluxos celulares obtidos pela Equação (6) e mostrados na Figura (23).

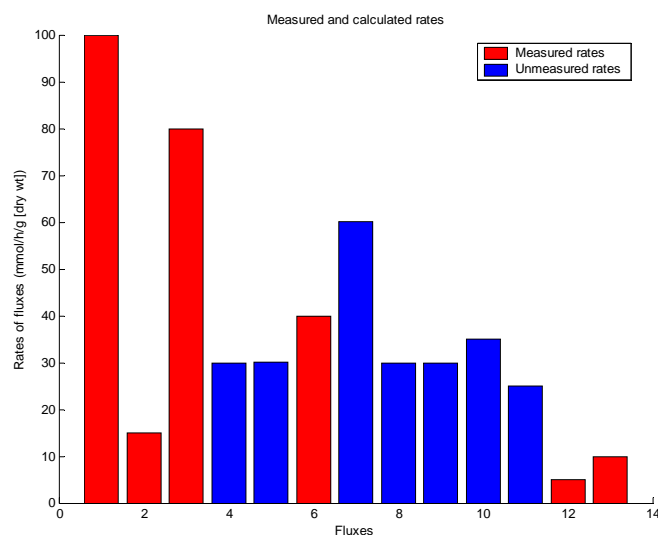


Figura 23 – Taxas dos fluxos medidos e não medidos. Gráfico de saída do ME Toolbox.

A resposta exclusiva da função MFAIL são os estados de marcação dos produtos. Cada estado de marcação dos substratos gera uma resposta diferente nos estados de marcação nos produtos. Veja, por exemplo, o estado de marcação descrito pela Equação (54) (Figura 24).

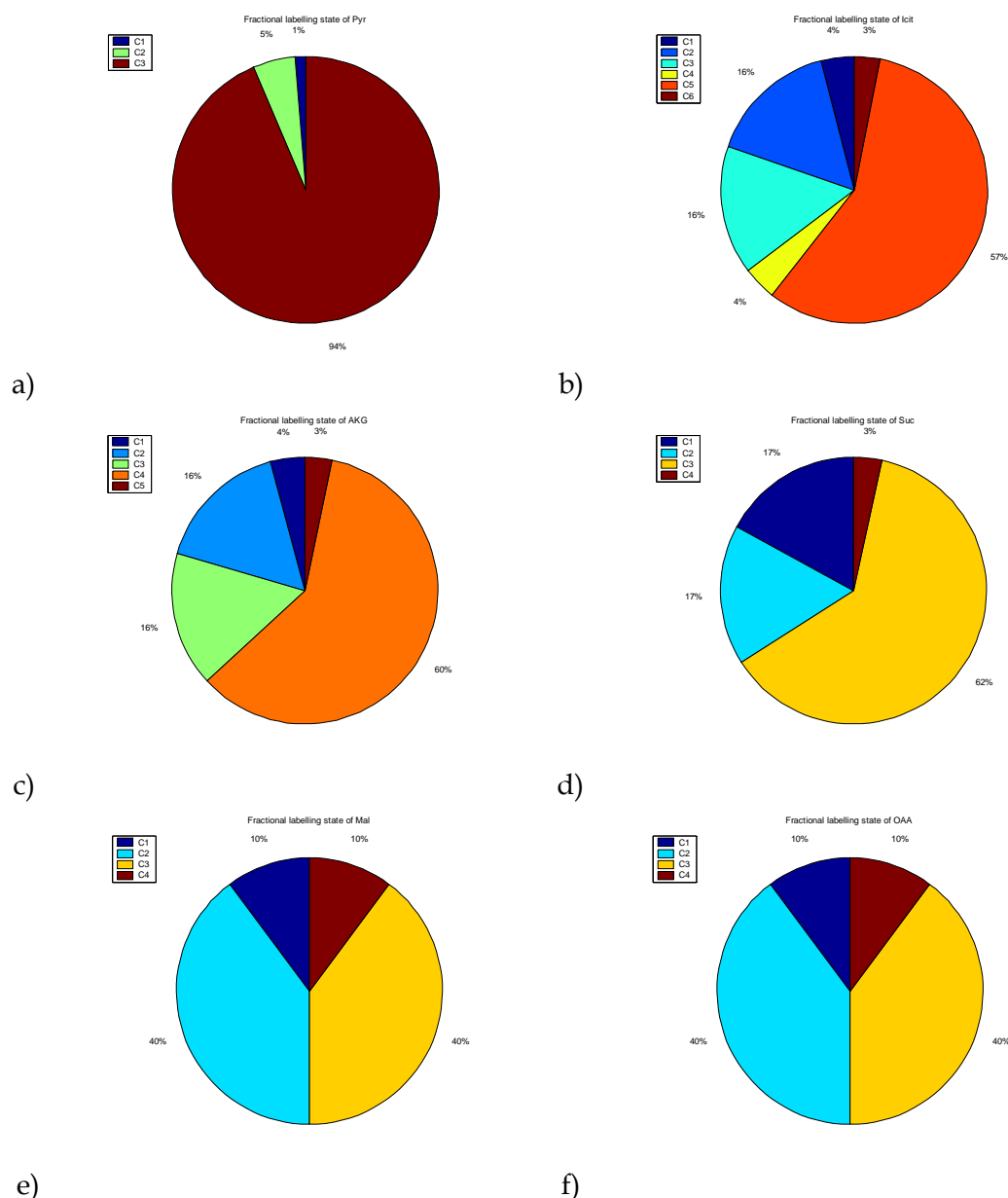


Figura 24 – Frações de distribuição dos carbonos marcados como resposta a moléculas de piruvato marcadas no terceiro carbono. a) piruvato, b) isocitrato, c) α -cetoglutarato, d) succinato, e) malato e f) oxaloacetato. Gráficos de saída do ME Toolbox.

Percebe-se que, apesar de o piruvato entrar no metabolismo apenas com seu terceiro carbono marcado, o produto do metabolismo também gera moléculas de piruvato marcadas no primeiro e no segundo carbono. Isso ocorre porque o piruvato também é produto de reação na via metabólica a partir do malato. Como o terceiro carbono marcado do piruvato é passado para o quinto carbono do isocitrato através da reação 4 (Tabela 14), era de se esperar que as moléculas de isocitrato marcadas no quinto carbono fossem mais numerosas.

Vejamos agora o que acontece quando o terceiro carbono do α -cetoglutarato é o único carbono marcado (Equação 55):

$$\begin{aligned} \text{xpyr_in} &= [0;0;0], \\ \text{xakg_in} &= [0;0;1;0;0]. \end{aligned} \quad (55)$$

A função MFAIL passa a ter a seguinte resposta para os estados de marcação (Figura 25).

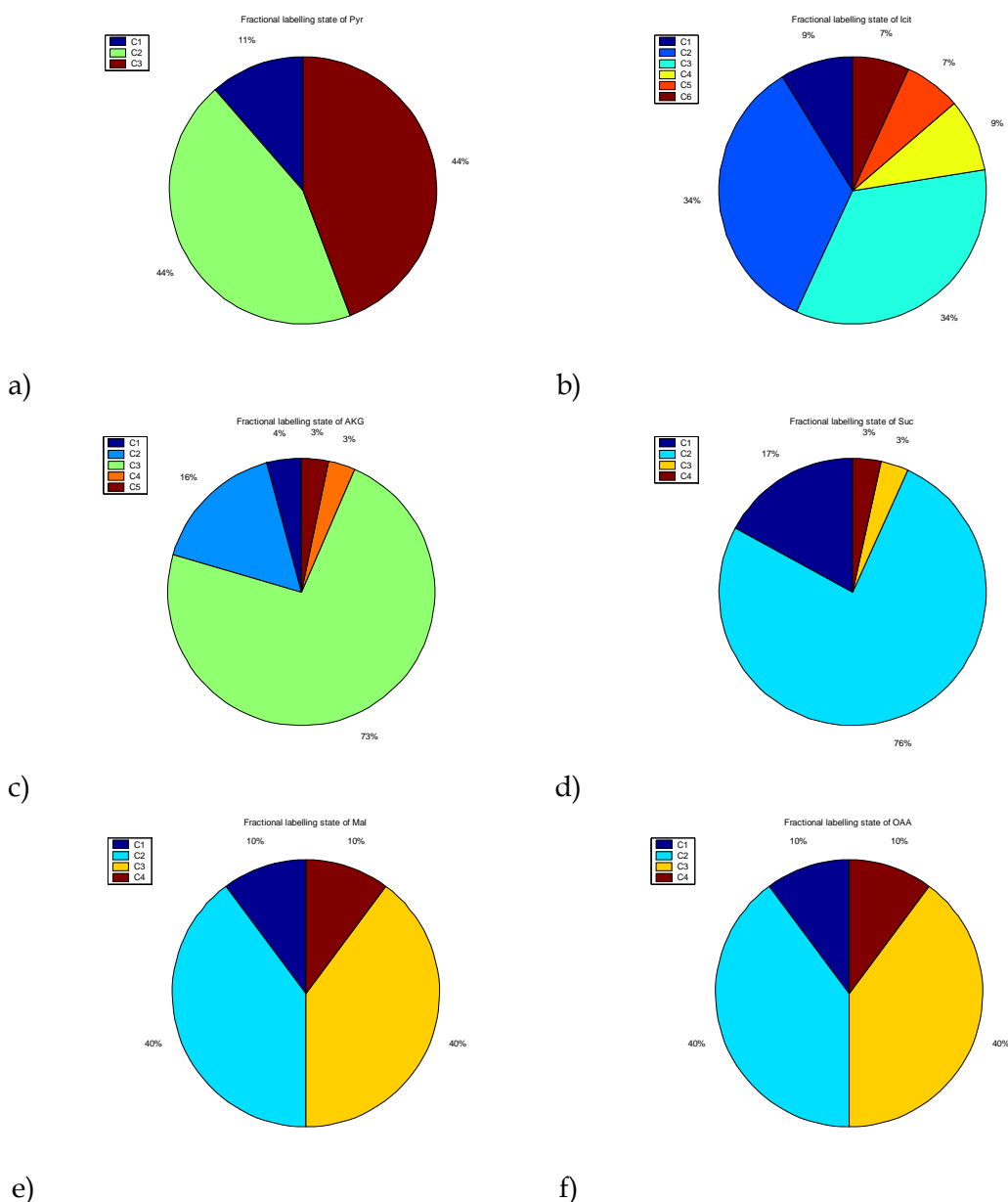


Figura 25 – Frações de distribuição dos carbonos marcados como resposta a moléculas de α -cetoglutarato marcadas no terceiro carbono. a) piruvato; b) isocitrato; c) α -cetoglutarato; d) succinato; e) malato e f) oxaloacetato. Gráficos de saída do ME Toolbox.

A mesma situação observada na Figura (24) ocorre agora quando as moléculas de α -cetoglutarato estão marcadas no terceiro carbono. O produto do metabolismo também gera moléculas de α -cetoglutarato marcadas nos demais carbonos. Como o terceiro carbono do α -cetoglutarato é passado para o segundo carbono do succinato através da reação 7 (Tabela 14), era de se esperar que as moléculas de succinato marcadas no segundo carbono fossem mais numerosas.

4.4. Exemplos hipotéticos do uso das funções MCA e MCAB

Como última contribuição do ME Toolbox, serão mostrados alguns exemplos hipotéticos e as respostas obtidas pelas funções MCA e MCAB. Como foi dito anteriormente, a função MCA é utilizada apenas para vias lineares, isto é, que não possuem ponto de bifurcação.

Suponha os seguintes dados de entrada para a função MCA (Equação 56).

```
% Nível de substrato
s = 1;

% Nível de produto
p = 0.01;

% Constantes cinéticas
En = [1,1,1,1];
kcat = [2,5,1,1];
Keq = [1,1,1,1];
km = [1,1,1,1];

% Enzima que será superexpressa
o = 4;

% Nível de superexpressão
lev = 5;

% Há inibição?
answ = 'y';

% Que metabólito "i" inibe a enzima "j"?
inhib = [3,2];

% Constantes de inibição
Ki = [0.1];
```

(56)

Os dados mostram uma via metabólica de quatro reações cujas equações cinéticas são descritas pela Equação (33). Nessa via metabólica hipotética, o metabólito 3 exerce inibição sobre a segunda enzima. O nível de expressão da quarta enzima é gradativamente aumentado até alcançar cinco vezes o valor original.

A partir da entrada de dados da Equação (56), a função MCA gera o seguinte resultado (Figura 26).

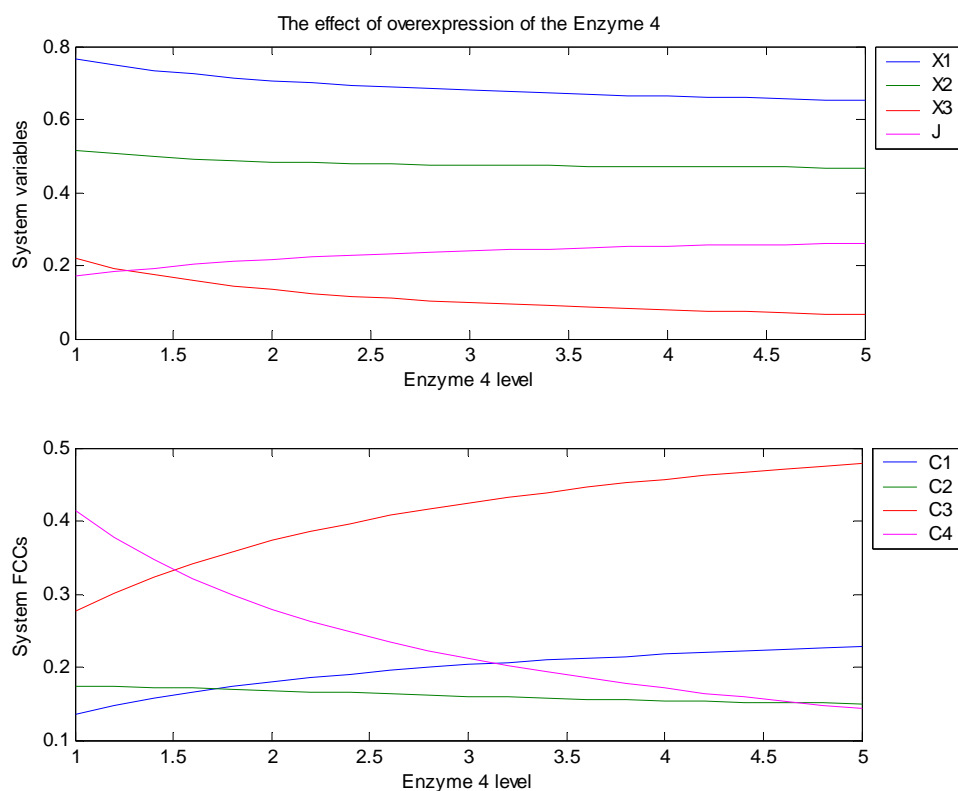


Figura 26 – Modelagem de uma via metabólica linear de quatro enzimas com inibição do metabólito 3 sobre a enzima 2. O gráfico mostra as concentrações de cada metabólito (X1, X2 e X3), o fluxo metabólico no estado estacionário (J) e os coeficientes de controle de fluxo para cada enzima da via metabólica (C1, C2, C3 e C4). Gráficos de saída do ME Toolbox.

Um dado importante a ser salientado é com relação aos coeficientes de controle de fluxo (FCCs). Relembrando a Equação (7), os coeficientes de controle de fluxo são definidos como a taxa da variação relativa no fluxo sobre a variação relativa na atividade da enzima. Como a variação da atividade

enzimática da enzima 4 é cada vez maior por ser esta a enzima que está sendo superexpressa, é previsível que o controle desta enzima sobre o fluxo da via seja cada vez menor. No entanto, o que explicaria a sensível queda no FCC da enzima 2? A resposta está na inibição que o metabólito 3 está exercendo sobre ela. A redução na atividade enzimática da enzima 2 faz com que aumente sua variação e, conseqüentemente, diminui seu FCC. Para uma simples comprovação, a inibição foi retirada (Figura 27).

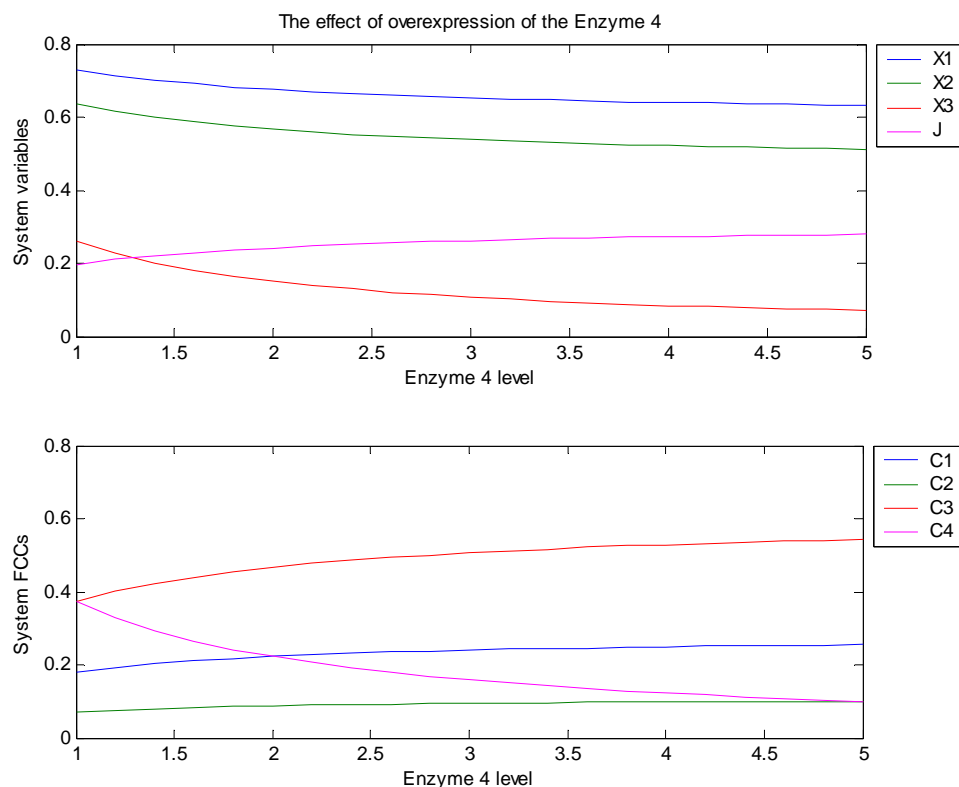


Figura 27 – Modelagem de uma via metabólica linear de quatro enzimas sem inibição. O gráfico mostra as concentrações de cada metabólito (X1, X2 e X3), o fluxo metabólico no estado estacionário (J) e os coeficientes de controle de fluxo para cada enzima da via metabólica (C1, C2, C3 e C4). Gráficos de saída do ME Toolbox.

A queda no FCC da enzima 2 não mais existe.

Agora um exemplo de uma via bifurcada com uma reação de produção e três reações de consumo (Figura 28).

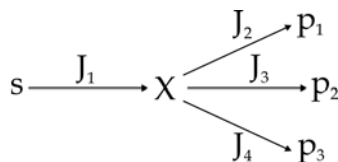


Figura 28 – Esquema de uma via bifurcada composta por quatro reações, uma de consumo do substrato e três de produção de produtos.

Suponha os seguintes dados de entrada para a função MCAB (Equação 57).

```

% Nível de substrato
s = [1];

% Níveis de produtos
p = [0.01,0.02,0.01];

% Constantes cinéticas
En = [1,1,1,1];
kcat = [2,5,1,1];
Keq = [1,1,1,1];
km = [1,1,1,2];

% Vetor dos fluxos
J = [4,1.5,1,1.5];

% Fluxo dependente
dep = 2;

% Nível de superexpressão
lev = 5;

```

(57)

Os dados de entrada mostram um ponto de bifurcação com um substrato gerando três produtos, constantes cinéticas segundo as Equações (35 e 36), um vetor dos fluxos no estado estacionário (situação inicial). O nível de expressão da enzima 2 é gradativamente aumentado até alcançar cinco vezes o valor original.

A partir da entrada de dados da Equação (57), a função MCAB gera o seguinte resultado (Figura 29).

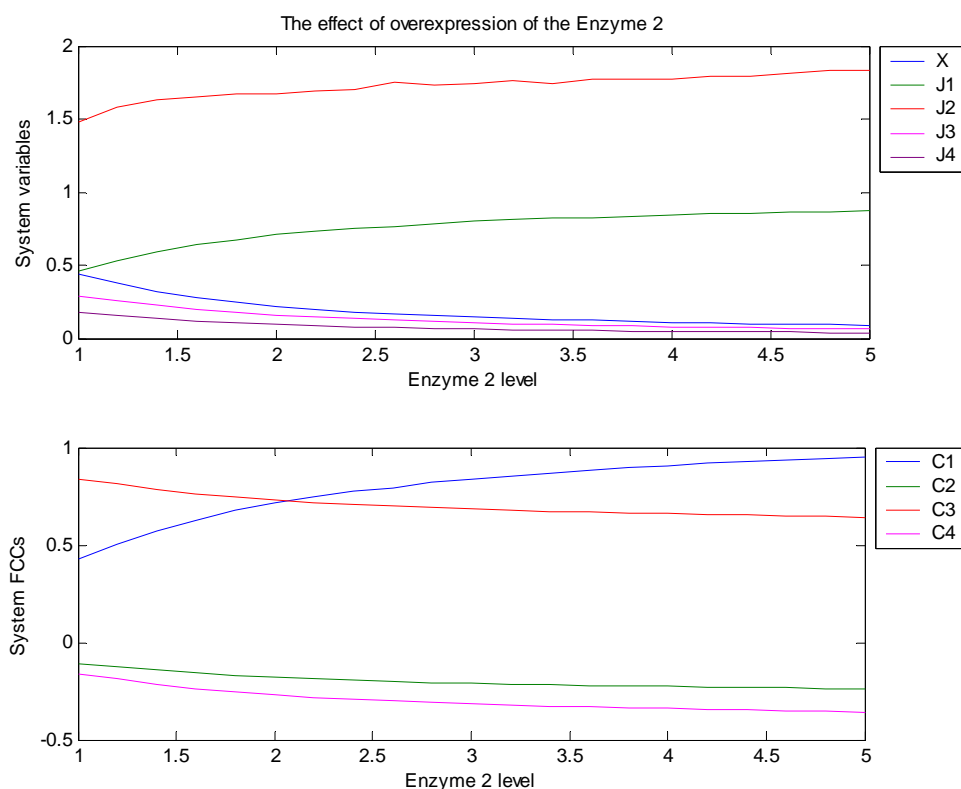


Figura 29 – Modelagem de uma via metabólica bifurcada de quatro enzimas, uma reação de produção e três de consumo do metabólito. O gráfico mostra a concentração do metabólito (X), cada um dos fluxos metabólicos no estado estacionário (J1, J2, J3 e J4) e os coeficientes de controle de fluxo para cada enzima da via metabólica (C1, C2, C3 e C4). Gráficos de saída do ME Toolbox.

Como é mostrado na Figura (29), quanto maior o nível de expressão da enzima 2, menor é a concentração do metabólito X. Isso ocorre porque a enzima 2 catalisa uma das reações de consumo do metabólito X e, portanto, quanto maior a expressão, maior será o consumo. A superexpressão obviamente ocasiona um aumento no fluxo 2 (J2). Para que haja conservação da massa, o fluxo 1 também precisa aumentar. O aumento do fluxo 1 gera um grande aumento em seu FCC. Com relação ao fluxo 2, o mesmo teve uma grande variação na atividade enzimática, ocasionando diminuição do FCC.

Veja agora o que acontece quando dois substratos geram dois produtos (Figura 30).

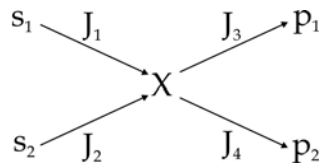


Figura 30 – Esquema de uma via bifurcada composta por quatro reações, duas de consumo de substratos e duas de produção de produtos.

Suponha os seguintes dados de entrada para a função MCAB (Equação 58).

```

% Nível de substrato
s = [1,2];

% Níveis de produtos
p = [0.01,0.02];

% Constantes cinéticas
En = [1,1,1,1];
kcat = [2,5,1,1];
Keq = [1,1,1,1];
km = [1,1,1,2];

% Vetor dos fluxos
J = [4,1.5,2,3.5];

% Fluxo dependente
dep = 2;

% Nível de superexpressão
lev = 5;

```

(58)

As constantes cinéticas são as mesmas, mas agora a enzima 2 catalisa uma reação de produção e não de consumo. A partir da entrada de dados da Equação (58), a função MCAB gera o seguinte resultado (Figura 31).

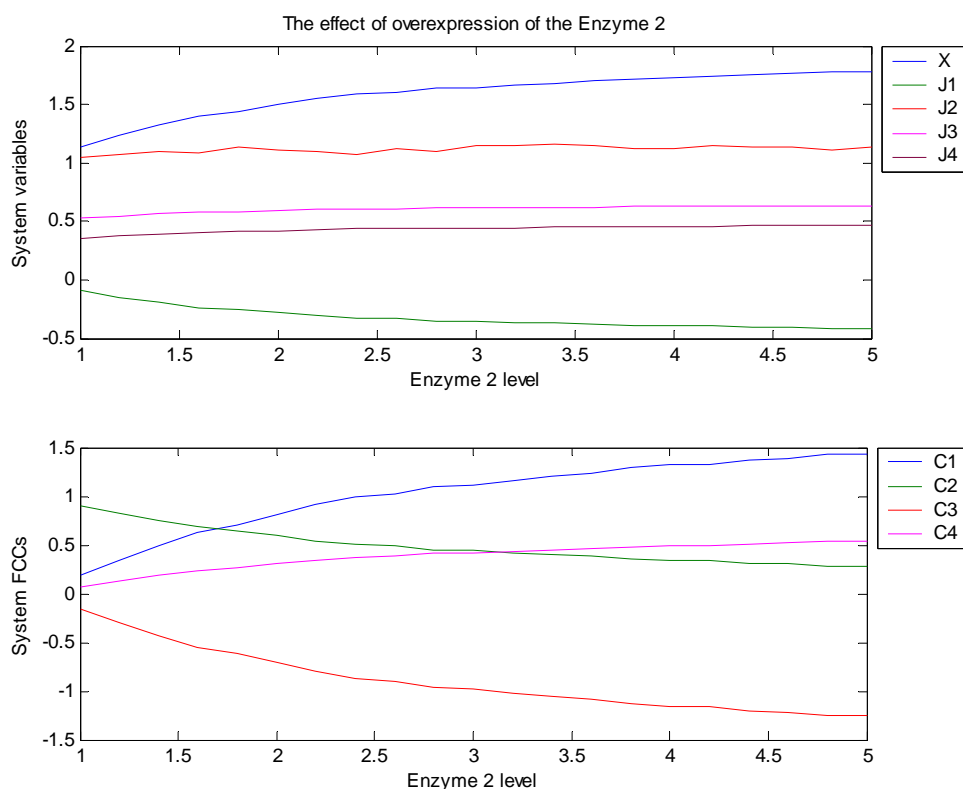


Figura 31 – Modelagem de uma via metabólica bifurcada de quatro enzimas, duas reações de produção e duas de consumo do metabólito. O gráfico mostra a concentração do metabólito (X), cada um dos fluxos metabólicos no estado estacionário (J1, J2, J3 e J4) e os coeficientes de controle de fluxo para cada enzima da via metabólica (C1, C2, C3 e C4). Gráficos de saída do ME Toolbox.

Nessa nova situação, quanto maior o nível de expressão da enzima 2, maior a concentração do metabólito X, visto que agora a enzima 2 catalisa uma das reações de sua produção. Outro dado importante a ser observado é que, devido a variação na atividade enzimática, o FCC da enzima 2 cai novamente.

CAPÍTULO V

Conclusões e Sugestões

5.1. Conclusões

O presente trabalho mostrou o desenvolvimento e a utilização de um toolbox de Engenharia Metabólica para o MATLAB®, o ME Toolbox, que executa a análise de fluxo metabólico (MFA) e a análise de controle metabólico (MCA). A função MFA do ME Toolbox permite a obtenção de fluxos celulares desconhecidos a partir da medida experimental de alguns fluxos, faz uma reconciliação estatística, recalculando todos os fluxos e melhorando os dados experimentais, mostra dados de estado do sistema e faz uma análise de sensibilidade. A função MFAIL permite a obtenção dos fluxos intracelulares e das frações de distribuição dos carbonos marcados para as análises de fluxo metabólico que utilizam métodos de marcadores isotópicos. A função MFAOP é uma poderosa ferramenta para sistemas subdeterminados. Ela calcula todos os fluxos celulares a partir de apenas um único dado experimental e da função objetivo baseada na minimização do gasto energético. Além disso, a MFAOP também executa a análise de sensibilidade. As funções MCA e MCAB executam uma análise de controle metabólico em vias lineares e bifurcadas, respectivamente. Com elas é possível obter a evolução dos controladores de fluxo e das variáveis do sistema quando a expressão de uma enzima é modificada, sendo facilmente ajustável a várias situações de interesse.

Devido ao grande número de resultados e fácil operação, o ME Toolbox é uma ferramenta poderosa, integrando a grande maioria dos cálculos que constituem a análise de fluxo metabólico e análise de controle metabólico.

Com o uso da função MFA foi realizada a análise de fluxo metabólico da bactéria *Clostridium butyricum* crescendo em glicose e glicerol. Através dessa análise foi possível verificar a sensibilidade das vias metabólicas e comparar os meios de cultura. Quando o glicerol é usado como principal fonte de carbono, 1,3-propanodiol é produzido em grande quantidade. As enzimas glicerol-

dehidratase e 1,3-propanodiol desidrogenase são ativadas e o glicerol é convertido a 1,3-propanodiol. No entanto, a análise de fluxo metabólico forneceu resultados que indicaram uma rota alternativa. Segundo a análise de sensibilidade, a deleção do gene produtor da enzima glicerol desidratase, responsável pela via de produção de 1,3-propanodiol, combinado com a alimentação com glicerol é a melhor estratégia para obtenção de uma *Clostridium* super-produtora de hidrogênio. Sem o uso desta ferramenta não seria possível esta conclusão. Desta forma, este trabalho demonstra uma possível rota biológica, onde o glicerol pode ser usado como substrato em uma bactéria geneticamente modificada, produtora de hidrogênio. Cabe ressaltar que o glicerol é subproduto da produção de biodiesel. A confirmação experimental da hipótese obtida pela análise de sensibilidade pode dar uma finalidade altamente nobre e lucrativa ao glicerol gerado na produção de biodiesel.

Utilizando a função MFAOP foi possível fazer a análise de fluxo metabólico para a produção de violaceína por *Chromobacterium violaceum*. O resultado é um mapa geral estimado da distribuição dos fluxos metabólicos supondo que o objetivo desta bactéria é ter o menor gasto de energia possível. Além disso, a análise de sensibilidade fornecida pela função MFAOP confirmou resultados experimentais relacionados à alimentação com glicose e glicerol, mostrando que o glicerol é bem mais eficiente na produção de violaceína. A análise de sensibilidade ainda indicou que o caminho mais eficiente para mutação genética seria inibir o gene responsável pela produção de isoleucina.

5.2. Sugestões para trabalhos futuros

Em cada um dos assuntos abordados neste trabalho, seja na produção biológica de hidrogênio, seja na produção biológica de violaceína, seja no uso e melhoramento do ME Toolbox, surgiram várias possibilidades novas de trabalho:

- Executar a mutação genética em *Clostridium butyricum* proposta neste trabalho e seguir com alimentação com glicerol. A confirmação da análise feita neste trabalho pode ser uma revolução na produção energética por via bacteriana;
- Obter fluxos extracelulares da *Chromobacterium violaceum* para fazer uma análise de fluxo metabólico de um sistema determinado ou superdeterminado, como foi feito com a *Clostridium butyricum*;
- Executar a mutação genética em *Chromobacterium violaceum* proposta, também tendo glicerol como principal fonte de carbono;
- Tentar tornar a função MFAIL mais automatizada. A necessidade de interação do usuário sobre sistema linear do balanço carbono a carbono torna esta função muito complicada;
- Melhoramentos nas demais funções do ME Toolbox, como, por exemplo, a criação de uma interface gráfica onde o usuário entre com reações e não com a matriz estequiométrica.

CAPÍTULO VI

Referências Bibliográficas

- August, P. R., Grossman, T. H., Minor, C., Draper, M. P., MacNeil, I. A., Pemberton, J. M., Call, K. M., Holt, D. e Osburne, M. S.** (2000). Sequence analysis and functional characterization of the violacein biosynthetic pathway from *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2: 513-519.
- Bell, S. L. e Palsson, B. O.** (2005). Phenotype phase plane analysis using interior point methods. *Computers and Chemical Engineering* 29: 481-486.
- Chatziannou, A., Palaiologos, G. e Kolisis, F. N.** (2003). Metabolic flux analysis as a tool for the elucidation of the metabolism of neurotransmitter glutamate. *Metab Eng* 5: 201-210.
- Cortassa, S., Aon, M. A., Iglesias, A. A. e Lloyd, D.** (2002). *An Introduction to Metabolic and Cellular Engineering*. World Scientific. New Jersey, London, Singapore, Hong Kong.
- Debabrata, D. e Nejat, V. T.** (2001). Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy* 26: 13-28.
- Goudel, A. M., Mendes, E. e Porto, L. M.** (2005). *CvioCyc*. Disponível em: <<http://cviocyc.intelab.ufsc.br>>. Acesso em: 14 fev. 2005.
- Hallenbeck, P. C. e Benemann, J. R.** (2002). Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy* 27: 1185-1193.
- Heijnen, J. J., van Gulik, W. M., Shimizu, H. e Stephanopoulos, G.** (2004). Metabolic flux control analysis of branch points: an improved approach to obtain flux control coefficients from large perturbation data. *Metabolic Engineering* 6: 391-400.

Levin, D. B., Pitt, L. e Love, M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy* 29: 173-185.

McCabe, B. J. e Previs, S. F. (2004). Using isotope tracers to study metabolism: application in mouse models. *Metab Eng* 6: 25-35.

Metzler, D. E. (1977). *Biochemistry: the chemical reactions of living cells*. Academic Press. New York.

Nadeau, I., Sabatie, J., Koehl, M., Perrier, M. e Kamen, A. (2000). Human 293 cell metabolism in low glutamine-supplied culture: interpretation of metabolic changes through metabolic flux analysis. *Metab Eng* 2: 277-292.

Nielsen, L.K. (2001). *Metabolic Engineering*. University of Queensland, Brisbane, Austrália.

Oliveira, C.G. (2005). Regulação Gênica da Biossíntese de Violaceína e Quorum Sensing em *Chromobacterium violaceum*. Tese (Doutorado), Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

Ozkan, P., Sariyar, B., Utkur, F. O., Akman, U. e Hortacsu, A. (2005). Metabolic flux analysis of recombinant protein overproduction in *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal* 22: 167-195.

Saint-Amans, S., Girbal, L., Andrade, J., Ahrens, K. e Soucaille, P. (2001). Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 grown on glucose-glycerol mixtures. *J Bacteriol* 183: 1748-1754.

Shimizu, H., Tanaka, H., Nakato, A., Nagahisa, K., Kimura, E. e Shioya, S. (2003). Effects of the changes in enzyme activities on metabolic flux redistribution around the 2-oxoglutarate branch in glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Bioprocess Biosyst Eng* 25: 291-298.

Shirai, T., Nakato, A., Izutani, N., Nagahisa, K., Shioya, S., Kimura, E., Kawarabayasi, Y., Yamagishi, A., Gojobori, T. e Shimizu, H. (2005).

Comparative study of flux redistribution of metabolic pathway in glutamate production by two coryneform bacteria. *Metab Eng* 7: 59-69.

Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A. e Nielsen, J. (1998). *Metabolic Engineering: principles and methodologies*. Academic Press. San Diego.

Stephanopoulos, G. (1998). Metabolic engineering. *Biotechnol Bioeng* 58: 119-120.

Vallino, J. J. e Stephanopoulos, G. (1993). Metabolic Flux Distributions in *Corynebacterium glutamicum* During Growth and Lysine Overproduction. *Biotechnology and Bioengineering* 41: 633-646.

Varma, A., Boesch, B. W. e Palsson, B. O. (1993). Stoichiometric Interpretation of Escherichia-Coli Glucose Catabolism under Various Oxygenation Rates. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 2465-2473.

Vasconcelos, A. T. R. d. et al. (2003). The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11660-11665.

CAPÍTULO VII

Apêndice

7.1. Função MFA do ME Toolbox

```
% MFA.M (Part of ME Toolbox)
% Version: 1.0
%
% Description: Makes the metabolic flux analysis.
% [vc,R,rk,vmnew,vcnew,h,e,answ,C,accum,spec] = MFA(G,vm,p,pcs) Makes the
% metabolic flux analysis of determined and overdetermined systems.
%
% Authors: Erlon Mendes & Luismar Porto
% Date: March 11, 2006
%
% Local Parameters:
% input:
%     G = stoichiometric matrix.
%     vm = rates of measured fluxes.
%     p = vector of relative positions of measured fluxes in the
%     stoichiometric matrix.
%     pcs = relative position of the unmeasured flux of interest
%     for specific sensitivity analysis.
%
% output:
%     vc = rates of unmeasured fluxes.
%     R = redundancy matrix.
%     rk = redundancy matrix's rank.
%     vmnew = new rates of measured fluxes, by statistical
%     reconciliation.
%     vcnew = new rates of unmeasured fluxes, by statistical
%     reconciliation.
%     h = test function  $\chi^2$  distributed.
%     e = residual vector.
%     answ = answer if the solution is unique or not.
%     C = condition number.
%     accum = accumulated sensitivities vector.
%     spec = specific sensitivities vector, related to the
%     "pcs" flux.
%
%
% Ref.: Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A. and Nielsen, J. (1998). Metabolic
% Engineering : principles and methodologies. Academic Press. San Diego.
%
% The toolbox is distributed under the GNU General Public Licence
% (Free Software Foundation 1991; http://www.gnu.org)

function [vc,R,rk,vmnew,vcnew,h,e,answ,C,accum,spec] = MFA(G,vm,p,pcs)

Gt = G';

% Measured rates
Gtm = Gt(:,p);

% Unmeasured rates
sgt = size(Gt);
j = 1;
i = 1;
for k=1:sgt(2)
    if j == length(p)+1
        for l=k:sgt(2)
```

```

        q(i) = 1;
    end
    break;
end
if k == p(j)
    j = j+1;
else
    q(i) = k;
    i = i+1;
end
end

Gtc = Gt(:,q);
vc = -pinv(Gtc)*Gtm*vm;

figure
hold on
title('Measured and calculated rates')
bar(p,vm,'r')
bar(q,vc,'b')
ylabel('Rates of fluxes (mmol/h/g [dry wt])')
xlabel('Fluxes')
legend('Measured rates','Unmeasured rates',2)
hold off

% Statistical reconciliation of the measurements

% Redundancy matrix
R = (Gtm - Gtc*pinv(Gtc)*Gtm);
rk = rank(R, 1e-10);

% Reduced redundancy matrix
sg = size(G);
K = [ones(1,rk),zeros(1,sg(2)-rk)];
Rred = K*R;

% Rred = R(1:rk,:);

% Test
e = Rred*vm;
h = e'*inv(Rred*Rred')*e;

% New estimates for the measured rates
vmnew = (eye(length(p))-Rred'*inv(Rred*Rred')*Rred)*vm;

% New estimates for the unmeasured rates
vcnew = -pinv(Gtc)*Gtm*vmnew;

figure
hold on
title('New measured and calculated rates')
bar(p,vmnew,'r')
bar(q,vcnew,'b')
ylabel('Rates of fluxes (mmol/h/g [dry wt])')
xlabel('Fluxes')
legend('Measured rates','Unmeasured rates',2)
hold off

Nc = null(Gtc);
if rank(Nc)==0
    ans='This is an unique solution';
else
    ans='This isn\'t an unique solution';
end

% Sensitivity analysis
C = norm(Gt)*norm(pinv(Gt));
sens = -pinv(Gtc)*Gtm;

```

```

accum = sum(abs(sens));

figure
hold on
title('Accumulated sensitivities')
bar(p,accum,'g')
hold off

pcs = find(q==pcs);
if isempty(pcs)
    error('The flux for sensitivity is not a unmeasured flux')
else
    spec = abs(sens(pcs,:));
    figure
    hold on
    title('Specific sensitivities')
    bar(p,spec,'m')
    hold off
end

```

7.2. Função MFAIL do ME Toolbox

```
% MFAIL.M (Part of ME Toolbox)
% Version: 1.0
%
% Description: Makes the metabolic flux analysis by isotope labelling
% methods.
% [vc,answ,xpyr,xicit,xakg,xsuc,xmal,xoaa] = MFAIL(G,vm,p) Makes the
% metabolic flux analysis of determined and overdetermined systems by
% isotope labelling methods.
%
% Authors: Erlon Mendes & Luismar Porto
% Date: March 11, 2006
%
% Local Parameters:
% input:
%     G = stoichiometric matrix.
%     vm = rates of measured fluxes.
%     p = vector of relative positions of measured fluxes in the
%         stoichiometric matrix.
%
% output:
%     vc = rates of unmeasured fluxes.
%     answ = answer if the solution is unique or not.
%     x = fractional labelling states.
%
% Ref.: Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A. and Nielsen, J. (1998). Metabolic
% Engineering : principles and methodologies. Academic Press. San Diego.
%
% The toolbox is distributed under the GNU General Public Licence
% (Free Software Foundation 1991; http://www.gnu.org)

function [vc,answ,xpyr,xicit,xakg,xsuc,xmal,xoaa] = MFAIL(G,vm,p)

Gt = G';

% Measured rates
Gtm = Gt(:,p);

% Unmeasured rates
sgt = size(Gt);
j = 1;
i = 1;
for k=1:sgt(2)
    if j == length(p)+1
        for l=k:sgt(2)
            q(i) = l;
        end
        break;
    end
    if k == p(j)
        j = j+1;
    else
        q(i) = k;
        i = i+1;
    end
end

Gtc = Gt(:,q);
vc = -pinv(Gtc)*Gtm*vm;

figure
hold on
title('Measured and calculated rates')
```

```

bar(p,vm,'r')
bar(q,vc,'b')
ylabel('Rates of fluxes (mmol/h/g [dry wt])')
xlabel('Fluxes')
legend('Measured rates','Unmeasured rates',0)
hold off

Nc = null(Gtc);
if rank(Nc)==0
    answ='This is an unique solution';
else
    answ='This isn\'t an unique solution';
end

% Atomic mapping matrices
pyr = ['A','B','C'];
icit = ['d','c','b','a','C','B'];
pyr_icit = amm(pyr,icit);

oaa = ['a','b','c','d'];
icit = ['d','c','b','a','C','B'];
oaa_icit = amm(oaa,icit);

icit = ['A','B','C','D','E','F'];
akg = ['A','B','C','E','F'];
icit_akg = amm(icit,akg);

akg = ['A','B','C','D','E'];
suc = ['B','C','D','E'];
akg_suc = amm(akg,suc);

suc = ['A','B','C','D'];
mal = ['A','B','C','D'];
suc_mal8 = amm(suc,mal);

suc = ['A','B','C','D'];
mal = ['D','C','B','A'];
suc_mal9 = amm(suc,mal);

mal = ['A','B','C','D'];
oaa = ['A','B','C','D'];
mal_oaa = amm(mal,oaa);

mal = ['A','B','C','D'];
pyr = ['A','B','C'];
mal_pyr = amm(mal,pyr);

% Merging vm and vc
for i=1:length(p)
    v(p(i)) = vm(i);
    for j=1:length(q)
        v(q(j)) = vc(j);
    end
end
v = v';

% Initial labelling state
xpyr_in = [0;0;1];
xakg_in = [0;0;0;0;0];

% Fractional labelling state
%      Pyr
AKG
MAL
A
=
[ -sum(v(find(G(:,1)==-1)))*eye(length(pyr))
    zeros(length(pyr),length(akg))
    zeros(length(pyr),length(suc))
    zeros(length(pyr),length(oaa))] ;
%      Pyr
ICit
SUC
OAA
v(11)*mal_pyr

```



```

A = [A; sum(v(find(G(:,2)==1))*pyr_icit -sum(v(find(G(:,2)==-
1))*eye(length(icit))) zeros(length(icit),length(akg))
zeros(length(icit),length(suc)) zeros(length(icit),length(mal))
v(4)*oaa_icit]; % ICit

A = [A; zeros(length(akg),length(pyr)) v(5)*icit_akg
-sum(v(find(G(:,3)==-1))*eye(length(akg)) zeros(length(akg),length(suc))
zeros(length(akg),length(mal)) zeros(length(akg),length(oaa))];
% AKG

A = [A; zeros(length(suc),length(pyr))
zeros(length(suc),length(icit)) sum(v(find(G(:,4)==1))*akg_suc
-sum(v(find(G(:,4)==-1))*eye(length(suc)) zeros(length(suc),length(mal))
zeros(length(suc),length(oaa))]; % SUC

A = [A; zeros(length(mal),length(pyr))
zeros(length(mal),length(icit)) zeros(length(mal),length(akg))
(v(8)*suc_mal8+v(9)*suc_mal9 -sum(v(find(G(:,5)==-
1))*eye(length(mal)) zeros(length(mal),length(oaa))]; % MAL

A = [A; zeros(length(oaa),length(pyr))
zeros(length(oaa),length(icit)) zeros(length(oaa),length(akg))
zeros(length(oaa),length(suc)) sum(v(find(G(:,6)==1))*mal_oaa
-sum(v(find(G(:,6)==-1))*eye(length(oaa))]; % OAA

b = [-v(1)*xpyr_in
zeros(length(icit),1)
-v(6)*xakg_in
zeros(length(suc),1)
zeros(length(mal),1)
zeros(length(oaa),1)];

x = A\b; % A*x = b

n(1) = length(pyr);
n(2) = n(1) + length(icit);
n(3) = n(2) + length(akg);
n(4) = n(3) + length(suc);
n(5) = n(4) + length(mal);
n(6) = n(5) + length(oaa);

xpyr = x(1:n(1));
figure
pie(xpyr*10);legend('C1','C2','C3',2);title('Fractional labelling state of
Pyr')

xicit = x(n(1)+1:n(2));
figure
pie(xicit*10);legend('C1','C2','C3','C4','C5','C6',2);title('Fractional
labelling state of Icit')

xakg = x(n(2)+1:n(3));
figure
pie(xakg*10);legend('C1','C2','C3','C4','C5',2);title('Fractional labelling
state of AKG')

xsuc = x(n(3)+1:n(4));
figure
pie(xsuc*10);legend('C1','C2','C3','C4',2);title('Fractional labelling state
of Suc')

xmal = x(n(4)+1:n(5));
figure
pie(xmal*10);legend('C1','C2','C3','C4',2);title('Fractional labelling state
of Mal')

xoaa = x(n(5)+1:n(6));

```

```
figure
pie(xoaa*10);legend('C1','C2','C3','C4',2);title('Fractional labelling state
of OAA')
```

7.3. Função AMM do ME Toolbox

```
% AMM.M (Part of ME Toolbox)
% Version: 1.0
%
% Description: Makes the atomic mapping matrix.
%   mn = AMM(m,n) Makes the atomic mapping matrix.
%
% Authors: Erlon Mendes & Luismar Porto
% Date: March 11, 2006
%
% Local Parameters:
%   input:
%       m = carbon configuration of reactant.
%       n = carbon configuration of product.
%
%   output:
%       mn = atomic mapping matrix.
%
% Ref.: Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A. and Nielsen, J. (1998). Metabolic
% Engineering : principles and methodologies. Academic Press. San Diego.
%
% The toolbox is distributed under the GNU General Public Licence
% (Free Software Foundation 1991; http://www.gnu.org)

function mn = AMM(m,n)

for i=1:length(m)
    for j=1:length(n)
        mn(i,j) = strcmp(m(i),n(j));
    end
end
mn = mn';
```

7.4. Função MFAOP do ME Toolbox

```
% MFAOP.M (Part of ME Toolbox)
% Version: 1.0
%
% Description: Makes the metabolic flux analysis.
% [x,fval,exitflag,output,lambda,C] = MFAOP(f,SP,EF,G,pcs) Makes the
% metabolic flux analysis of subdetermined systems.
%
% Authors: Erlon Mendes & Luismar Porto
% Date: March 11, 2006
%
% Local Parameters:
% input:
%     f = objective function.
%     SP = substrate positions.
%     EF = experimental flux.
%     G = stoichiometric matrix.
%     pcs = relative position of the interest flux for specific
% sensitivity analysis.
%
% output:
%     x = metabolic flux vector.
%     fval = objective function value in "x".
%     exitflag = describes the exit condition. > 0 when LINPROG
% converged with a solution X. 0 when LINPROG reached the maximum
% number of iterations without converging. < 0 when the problem was
% infeasible or LINPROG failed.
%     output = interactions number.
%     lambda = set of Lagrangian multipliers.
%     C = conditional number.
%
%
% Ref.: Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A. and Nielsen, J. (1998). Metabolic
% Engineering : principles and methodologies. Academic Press. San Diego.
%
% The toolbox is distributed under the GNU General Public Licence
% (Free Software Foundation 1991; http://www.gnu.org)

function [x,fval,exitflag,output,lambda,C] = MFAOP(f,SP,EF,G,pcs)

% ____Linear programming____
Gt = G';
sG = size(Gt);

% Equalities of the system
beq = zeros(sG(1),1);

% Inequalities of the system
A = zeros(2,sG(2));
sSP = size(SP);

for i=1:sSP(1)
    A(SP(i,1),SP(i,2)) = 1;
end

b = ones(SP(i,1),1)*10;

% Lower bounds
lb = zeros(sG(2),1);

% Optimization solve
[x,fval,exitflag,output,lambda] = linprog(f,A,b,Gt,beq,lb);
C = cond(lambda);
```

```

% Use of experimental data
x = x.*EF(2)/x(EF(1));

% Flux display
figure
hold on
bar(x,'b')
ylabel('Rates of fluxes (mmol/h/g [dry wt])')
xlabel('Fluxes')
hold off

% ____Sensitivity analysis____
p = find(f~=0);
pa2 = find(p==pcs);
p(pa2) = [];

% External rates
Gtm = Gt(:,p);

% Internal rates
sgt = size(Gt);
j = 1;
i = 1;
for k=1:sgt(2)
    if j == length(p)+1
        for l=k:sgt(2)
            q(i) = l;
        end
        break;
    end
    if k == p(j)
        j = j+1;
    else
        q(i) = k;
        i = i+1;
    end
end

Gtc = Gt(:,q);

C = norm(Gt)*norm(pinv(Gt));
sens = -pinv(Gtc)*Gtm;

% Accumulated sensitivities
accum = sum(abs(sens));

figure
hold on
title('Accumulated sensitivities')
bar(p,accum,'g')
hold off

% Specific sensitivities
pcs = find(q==pcs);
spec = abs(sens(pcs,:));

figure
hold on
title('Specific sensitivities')
bar(p,spec,'m')
hold off

```

7.5. Função MCA do ME Toolbox

```
% MCA.M (Part of ME Toolbox)
% Version: 1.0
%
% Description: Makes the metabolic control analysis of linear pathways.
% [xin,Ein,Cin,x,E,C,Xstore,Cstore,fcst,fcct] = MCA(o,lev) Makes the
% metabolic control analysis of linear pathways.
%
% Authors: Erlon Mendes & Luismar Porto
% Date: March 11, 2006
%
% Local Parameters:
% input:
%     o = enzyme overexpression.
%     lev = overexpression level.
%
% output:
%     xin = initial system variables vector.
%     Ein = initial elasticity matrix.
%     Cin = initial FCC matrix.
%     x = system variables vector.
%     E = elasticity matrix.
%     C = FCC matrix.
%     Xstore = system variables store.
%     Cstore = FCC store.
%     fcst = flux-control summation theorem.
%     fcct = flux-control connectivity theorem.
%
% Global Parameters:
%     s = input substrate concentration.
%     p = input product concentration.
%     En = vector of En(i) kinetics constants.
%     kcat = vector of kcat(i) kinetics constants.
%     Keq = vector of Keq(i) kinetics constants.
%     km = vector of km(i) kinetics constants.
%     answ = inhibition activation parameter.
%     inhib = inhibition matrix, with dimension (n x 2) where
%     "n" is the number of inhibitions, the first column is the
%     inhibitor metabolite and the second one is the inhibited enzyme.
%     Ki = vector of inhibition constants.
%
% Form of Kinetic Equations:
%
%          kcat(i)*(X(i-1) -  $\frac{X(i)}{Keq(i)}$ )
%
% v(i) = En(i) *  $\frac{X(i-1) + km(i) + \frac{X(i)}{Keq(i)}}{1 + \frac{X(inhib)}{Ki}}$ 
%
% where v(i) is the rate of the reaction "i" and X(inhib) is the
% metabolite that exert inhibition for the reaction "i".
%
% Ref.: Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A. and Nielsen, J. (1998). Metabolic
% Engineering : principles and methodologies. Academic Press. San Diego.
%
% The toolbox is distributed under the GNU General Public Licence
% (Free Software Foundation 1991; http://www.gnu.org)

function [xin,Ein,Cin,x,E,C,Xstore,Cstore,fcst,fcct] = MCA(o,lev)
global s p En kcat Keq km answ inhib Ki

Xstore = [];
Cstore = [];
```

```

for i=1:0.2:lev
    % Find steady state.
    En(o)=i;
    x = fminsearch('kinetics',ones(1,length(En)));

    % Find elasticity coefficients.
    e = elasticity(x);
    el = e';

    % Find control coefficients.
    es = size(el);
    E = [ones(1,es(2));el];

    C = E\eye(es(2));

    if i==1
        xin = x;
        Ein = E;
        Cin = C;
    end

    Xstore = [Xstore,x'];
    Cstore = [Cstore,C(:,1)];
end

% Flux-control theorems
Cs = size(C);
fcst = 0;
fcct = 0;
for i=1:Cs(1)
    fcst = fcst+C(i,1);
    for j=1:es(1)
        fcct = fcct+C(i,1)*el(j,i);
    end
end

if fcst==1
    fcst='Flux-control summation theorem is complied';
else
    fcst='Flux-control summation theorem is not complied';
end

if fcct<=1e-10
    fcct='Flux-control connectivity theorem is complied';
else
    fcct='Flux-control connectivity theorem is not complied';
end

```

7.6. Função KINETICS do ME Toolbox

```
% KINETICS.M (Part of ME Toolbox)
% Version: 1.0
%
% Description: Function used to find the system variables by minimum least
% square.
%   x = fminsearch('KINETICS',[1,1]) finds the system variables by minimum
%   least
%   square.
%
% Authors: Erlon Mendes & Luismar Porto
% Date: March 11, 2006
%
% Global Parameters:
%   s = input substrate concentration.
%   p = input product concentration.
%   En = vector of En(i) kinetics constants.
%   kcat = vector of kcat(i) kinetics constants.
%   Keq = vector of Keq(i) kinetics constants.
%   km = vector of km(i) kinetics constants.
%   answ = inhibition activation parameter.
%   inhib = inhibition matrix, with dimension (n x 2) where
%   "n" is the number of inhibitions, the first column is the
%   inhibitor metabolite and the second one is the inhibited enzyme.
%   Ki = vector of inhibition constants.
%
% Ref.: Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A. and Nielsen, J. (1998). Metabolic
% Engineering : principles and methodologies. Academic Press. San Diego.
%
% The toolbox is distributed under the GNU General Public Licence
% (Free Software Foundation 1991; http://www.gnu.org)

function f = KINETICS(x)
global s p En kcat Keq km answ inhib Ki

if answ == 'y'
    si = size(inhib);
    for i = 1:si(1)
        for j = 1:length(En)
            if j == inhib(i,2)
                it(j) = (1+x(inhib(i,1))/Ki(i));
            else
                it(j) = 1;
            end
        end
    end
else
    it(1:length(En)) = 1;
end

for i = 1:length(En)
    if i == 1
        v(i) = En(i)*kcat(i)*(s-x(i)/Keq(i))/(s+km(i)+x(i)/Keq(i))/it(i);
    elseif i == length(En)
        v(i) = En(i)*kcat(i)*(x(i-1)-p/Keq(i))/(x(i-1)+km(i)+p/Keq(i))/it(i);
    else
        v(i) = En(i)*kcat(i)*(x(i-1)-x(i)/Keq(i))/(x(i-1)+km(i)+x(i)/Keq(i))/it(i);
    end
end

f = 0;
for i=1:length(v);
    f = f+(v(i)-x(length(v)))^2;
end
```


end

7.7. Função ELASTICITY do ME Toolbox

```
% ELASTICITY.M (Part of ME Toolbox)
% Version: 1.0
%
% Description: Calculates Elasticity Coefficients
%   e = ELASTICITY(x) solves the Elasticity Coefficients for linear
%   pathways
%
% Authors: Erlon Mendes & Luismar Porto
% Date: March 11, 2006
%
% Local Parameters:
%   input:
%       x = system variables vector.
%   output:
%       e = calculated elasticity.
%
% Global Parameters:
%       s = input substrate concentration.
%       p = input product concentration.
%       En = vector of En(i) kinetics constants.
%       kcat = vector of kcat(i) kinetics constants.
%       Keq = vector of Keq(i) kinetics constants.
%       km = vector of km(i) kinetics constants.
%       answ = inhibition activation parameter.
%       inhib = inhibition matrix, with dimension (n x 2) where
%       "n" is the number of inhibitions, the first column is the
%       inhibitor metabolite and the second one is the inhibited enzyme.
%       Ki = vector of inhibition constants.
%
% Ref.: Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A. and Nielsen, J. (1998). Metabolic
% Engineering : principles and methodologies. Academic Press. San Diego.
%
% The toolbox is distributed under the GNU General Public Licence
% (Free Software Foundation 1991; http://www.gnu.org)

function e = ELASTICITY(x)
global s p En kcat Keq km answ inhib Ki

for i = 1:length(En)
    if i == 1
        e(i,i) = -(x(i)/Keq(i))/(s-x(i)/Keq(i))-
        (x(i)/Keq(i))/(s+km(i)+x(i)/Keq(i));
    elseif i == length(En)
        e(i,i-1) = x(i-1)/(x(i-1)-p/Keq(i))-x(i-1)/(x(i-1)+km(i)+p/Keq(i));
    else
        e(i,i) = -(x(i)/Keq(i))/(x(i-1)-x(i)/Keq(i))-(x(i)/Keq(i))/(x(i-
        1)+km(i)+x(i)/Keq(i));
        e(i,i-1) = x(i-1)/(x(i-1)-x(i)/Keq(i))-x(i-1)/(x(i-
        1)+km(i)+x(i)/Keq(i));
    end

    if answ == 'y'
        si = size(inhib);
        for j = 1:si(1)
            e(inhib(j,2),inhib(j,1)) =
            (x(inhib(j,1))/Ki(j))/(1+x(inhib(j,1))/Ki(j));
        end
    end
end
```

7.8. Função MCAB do ME Toolbox

```
% MCAB.M (Part of ME Toolbox)
% Version: 1.0
%
% Description: Makes the metabolic control analysis of branched pathways.
% [xin,Ein,Cin,x,E,C,Jstore,Xstore,Cstore,XJstore] = MCAB(J,dep,lev)
% Makes the metabolic control analysis of branched pathways.
%
% Authors: Erlon Mendes & Luismar Porto
% Date: March 11, 2006
%
% Local Parameters:
% input:
%     J = flux vector
%     dep = dependent flux.
%     lev = overexpression level.
%
% output:
%     xin = initial system variables vector.
%     Ein = initial elasticity matrix.
%     Cin = initial FCC matrix.
%     x = system variables vector.
%     E = elasticity matrix.
%     C = FCC matrix.
%     Jstore = flux rates store.
%     Xstore = system variables store.
%     Cstore = FCC store.
%     XJstore = combination of Xstore and Jstore.
%
% Global Parameters:
%     s = input substrate concentration.
%     p = input product concentration.
%     En = vector of En(i) kinetics constants.
%     kcat = vector of kcat(i) kinetics constants.
%     Keq = vector of Keq(i) kinetics constants.
%     km = vector of km(i) kinetics constants.
%     k = auxiliary parameter.
%
% Form of Kinetic Equations:
%
%           kcat(i)*(X(i-1) - _X(i)_
%                                     Keq(i)
%
% v(i) = En(i) * -----
%           X(i-1) + km(i) + _X(i)_
%                               Keq(i)
%
% where v(i) is the rate of the i-flux.
%
% Ref.: Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A. and Nielsen, J. (1998). Metabolic
% Engineering : principles and methodologies. Academic Press. San Diego.
%
% The toolbox is distributed under the GNU General Public Licence
% (Free Software Foundation 1991; http://www.gnu.org)

function [xin,Ein,Cin,x,E,C,Jstore,Xstore,Cstore,XJstore] = MCAB(J,dep,lev)
global s p En kcat Keq km k

Jstore = [];
Xstore = [];
Cstore = [];

Js = 0;
Jp = 0;
for i=1:length(s)
    Js = Js + J(i);
```

```

end
for i=1:length(p)
    Jp = Jp + J(i+length(s));
end

if Js == Jp
    % Stoichiometric matrix.
    G = [ones(length(s),1);-ones(length(p),1)];

    % Find fractional fluxes.
    j=1;
    for i=1:length(J)
        F(dep,i) = J(i)/J(dep);
        if dep~=i
            f(j) = F(dep,i);
            j = j+1;
        end
    end
    f = f';

    % Collect the rows of the stoichiometric matrix containing dependent
    fluxes
    % in the sub-matrix Gc and the remaining rows in the sub-matrix G0.
    Gc = G(dep);
    j=1;
    for i=1:length(G)
        if i~=dep
            G0(j) = G(i);
            j = j+1;
        end
    end

    % Generate Ljf to solve the linear system (Ljf,-el)*(Cj,in;Cx)=P
    aj = -inv(Gc')*G0';
    ajf = aj.*f;
    Lj = [eye(length(J)-1);aj'];
    Ljf = [eye(length(J)-1);ajf'];

    for i=1:0.2:lev
        % Find steady state.
        En(dep)=i;
        k=dep;
        x = fminsearch('kineticsb',[1,1]);

        % Find elasticity coefficients.
        e = elasticityb(x);
        el = e';

        % Find control coefficients.
        E = [Ljf,-el];
        C = E\eye(length(el));

        if i==1
            xin = x;
            Ein = E;
            Cin = C;
        end

        % Find all J fluxes.
        for j=1:length(s)
            J(j) = En(j)*kcat(j)*(s(j)-
x(1)/Keq(j))/(s(j)+km(j)+x(1)/Keq(j));
        end

        for j=1:length(p)
            J(length(s)+j) = En(length(s)+j)*kcat(length(s)+j)*(x(1)-
p(j)/Keq(length(s)+j))/(x(1)+km(length(s)+j)+p(j)/Keq(length(s)+j));
        end
    end

```

```

        Jstore = [Jstore,J'];
        Xstore = [Xstore,x'];
        Cstore = [Cstore,C(j,:)'];
    end
    XJstore = [Xstore(1,:);Jstore];
else
    error('The fluxes "J" don\'t respect the mass balance')
end

```

7.9. Função KINETICSB do ME Toolbox

```
% KINETICSB.M (Part of ME Toolbox)
% Version: 1.0
%
% Description: Function used to find the system variables by minimum least
% square.
%   x = fminsearch('KINETICSB',[1,1]) finds the system variables by minimum
%   least
%   square.
%
% Authors: Erlon Mendes & Luismar Porto
% Date: March 11, 2006
%
% Global Parameters:
%   s = input substrate concentration.
%   p = input product concentration.
%   En = vector of En(i) kinetics constants.
%   kcat = vector of kcat(i) kinetics constants.
%   Keq = vector of Keq(i) kinetics constants.
%   km = vector of km(i) kinetics constants.
%
% Ref.: Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A. and Nielsen, J. (1998). Metabolic
% Engineering : principles and methodologies. Academic Press. San Diego.
%
% The toolbox is distributed under the GNU General Public Licence
% (Free Software Foundation 1991; http://www.gnu.org)

function f = KINETICSB(x)
global s p En kcat Keq km k

for i=1:length(s)
    v(i) = En(i)*kcat(i)*(s(i)-x(1)/Keq(i))/(s(i)+km(i)+x(1)/Keq(i));
end
for i=1:length(p)
    v(length(s)+i) = En(length(s)+i)*kcat(length(s)+i)*(x(1)-
p(i)/Keq(length(s)+i))/(x(1)+km(length(s)+i)+p(i)/Keq(length(s)+i));
end
f = 0;
f = f+(v(k)-x(2))^2;
```

7.10. Função ELASTICITYB do ME Toolbox

```
% ELASTICITYB.M (Part of ME Toolbox)
% Version: 1.0
%
% Description: Calculates Elasticity Coefficients
%   e = ELASTICITYB(x) Calculates the Elasticity Coefficients for branched
%   pathways
%
% Authors: Erlon Mendes & Luismar Porto
% Date: March 11, 2006
%
% Local Parameters:
%   input:
%       x = system variables vector.
%   output:
%       e = calculated elasticity.
%
% Global Parameters:
%       s = input substrate concentration.
%       p = input product concentration.
%       En = vector of En(i) kinetics constants.
%       kcat = vector of kcat(i) kinetics constants.
%       Keq = vector of Keq(i) kinetics constants.
%       km = vector of km(i) kinetics constants.
%
% Ref.: Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A. and Nielsen, J. (1998). Metabolic
% Engineering : principles and methodologies. Academic Press. San Diego.
%
% The toolbox is distributed under the GNU General Public Licence
% (Free Software Foundation 1991; http://www.gnu.org)

function e = ELASTICITYB(x)
global s p En kcat Keq km

for i=1:length(s)
    e(i) = -(x(1)/Keq(i))/(s(i)-x(1)/Keq(i))-
    (x(1)/Keq(i))/(s(i)+km(i)+x(1)/Keq(i));
end
for i=1:length(p)
    e(length(s)+i) = x(1)/(x(1)-p(i)/Keq(length(s)+i))-
    x(1)/(x(1)+km(length(s)+i)+p(i)/Keq(length(s)+i));
end
```